

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. Alois Boos

Calcium-Fluxe, Vitamin D-Rezeptoren und Calbindin D9k im Darm des Pferdes

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Tobias Müller
Tierarzt
aus Bettwiesen/ TG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Alois Boos, Referent
PD Dr. Annette Liesegang, Korreferentin

Zürich 2010

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. Alois Boos

Calcium-Fluxe, Vitamin D-Rezeptoren und Calbindin D9k im Darm des Pferdes

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Tobias Müller
Tierarzt
aus Bettwiesen/ TG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Alois Boos, Referent
PD Dr. Annette Liesegang, Korreferentin

Zürich 2010

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	2
3	EINLEITUNG	3
4	LITERATURÜBERSICHT	5
4.1	Topographie und Morphologie des Gastrointestinaltraktes des Pferdes	5
4.1.1	Anatomie des Darmtraktes	5
4.1.2	Histomorphologie des Darmtraktes	8
4.1.2.1	Tunica mucosa	8
4.1.2.2	Tela submucosa	9
4.1.2.3	Tunica muscularis	9
4.1.2.4	Tunica adventitia/ Tunica serosa	9
4.1.3	Verdauungsphysiologie des Pferdes	9
4.2	Calcium-Metabolismus des Pferdes	10
4.2.1	Calcium-Absorption bei Säugetieren	11
4.2.1.1	Transzellulärer Transport	12
4.2.1.2	Parazellulärer Transport	13
4.2.2	Calcium-Konzentration im Blut des Pferdes	14
4.2.3	Calcium-Ausscheidung	14
4.2.4	Regulation des Calcium-Stoffwechsel	14
4.2.4.1	Parathormon	15
4.2.4.2	Calcitriol	15
4.2.4.3	Calcitonin	16
4.3	Vitamin D	17
4.3.1	Begriffsdefinitionen zum Vitamin D	17
4.3.2	Biotransformation von Vitamin D	18
4.3.3	Wirkungsmechanismus von Vitamin D	18
4.4	Vitamin D-Rezeptor	19
4.4.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	19
4.4.2	Struktur und Funktion	20
4.5	Calbindin	22
4.5.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	22
4.5.2	Struktur und Funktion	22
4.5.3	Calbindin D9k im Darm von Säugetieren	24
5	MATERIAL UND METHODEN	26
5.1	Probengewinnung	26
5.1.1	Versuchstiere	26
5.1.2	Aufbereitung des Probenmaterials	26

5.2	Ussing-Kammer Versuche	27
5.3	Immunhistochemie	28
5.3.1	Vitamin D-Rezeptor	28
5.3.2	Calbindin D9k	30
5.4	Westernblot	32
5.4.1	Aufarbeitung des Gewebes und Durchführung des Nachweises	32
5.4.2	Vitamin D-Rezeptor	32
5.4.3	Calbindin D9k	33
5.5	Qualitative RT-PCR	33
5.5.1	RNA-Isolierung	33
5.5.2	DNase-Behandlung	34
5.5.3	Reverse Transkription	35
5.5.4	Polymerase-Kettenreaktion	35
5.6	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR	38
5.6.1	TaqMan PCR Prinzip	38
5.6.2	Durchführung	38
5.6.3	Auswertung	40
6	RESULTATE	42
6.1	Ca-Flux Messungen in verschiedenen Darmabschnitten	42
6.2	Expression des VDR in den verschiedenen Darmabschnitten	43
6.2.1	Westernblot	43
6.2.2	Qualitative RT PCR	44
6.2.3	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR	44
6.3	Immunhistochemische Lokalisation des VDR	44
6.4	Expression von Calbindin D9k in verschiedenen Darmabschnitten	46
6.4.1	Westernblot	46
6.4.2	Qualitative RT PCR	47
6.4.3	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR	47
6.5	Immunhistochemische Lokalisation von Calbindin D9k	48
7	DISKUSSION	51
7.1	Ca-Fluxe im Gastrointestinaltrakt des Pferdes	51
7.2	Vitamin D-Rezeptor im Gastrointestinaltrakt des Pferdes	52
7.3	Calbindin D9k im Gastrointestinaltrakt des Pferdes	55
7.4	Schlussfolgerungen	56
8	LITERATURVERZEICHNIS	57
9	ANHANG	65
10	DANKSAGUNG	68
11	LEBENS LAUF	

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Lokalisation und die Höhe der aktiven Calcium-Resorption in Abhängigkeit vom Darmabschnitt beim Dickdarmverdauender Pferd zu bestimmen und die Resultate mit den Verhältnissen bei anderen Spezies zu vergleichen. Da Vitamin D und sein Rezeptor sowie Calbindin D9k eine zentrale Rolle bei der aktiven Ca-Aufnahme im Intestinaltrakt spielen, wurden sieben verschiedene Darmabschnitte von zehn Pferden auf der Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Zusätzlich wurden mit der Ussing-Kammer die Ca-Fluxe durch das Darmepithel gemessen.

Die Ergebnisse ergaben eine Korrelation der Ca-Transportelemente mit der aktiven Ca-Absorption. Im Duodenum sind sowohl die grössten Mengen an Vitamin D-Rezeptor und Calbindin D9k als auch positive Ca-Fluxe in der Ussing-Kammer vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass beim Pferd das Duodenum der Hauptort der aktiven Ca-Absorption ist. Teilweise konnten der Vitamin D-Rezeptor und Calbindin D9k auch im Dickdarm der Pferde nachgewiesen werden, welcher möglicherweise in die Regulation der aktiven Ca-Aufnahme bei einer Mangelversorgung involviert ist. Mittels Immunhistochemie konnte der Vitamin D-Rezeptor hauptsächlich in den Kernen der Enterozyten und dies vorwiegend in den Krypten lokalisiert werden. Calbindin D9k hingegen befindet sich überwiegend im Oberflächenepithel.

Da die intestinale aktive Ca-Absorption von der Menge an Ca im Futter abhängig ist, sind weitere Studien mit Fütterungsgruppen empfohlen.

2 SUMMARY

The aim of the current study was to investigate the localisation and the extent of the active calcium absorption in different segments of the intestinal tract of the horse as hindgut fermenter and to compare the results with other species. Vitamin D and his receptor as well as Calbindin D9k play a central role for the intestinal Ca absorption, therefore seven different intestinal segments of ten horses were examined on protein- and mRNA-level. Furthermore Ca fluxes through the intestinal epithelial layer were measured by Ussing-Chamber technique. The results demonstrate a correlation between the Ca transport elements and the active Ca absorption. The highest amounts of Vitamin D receptor and Calbindin D9k as well as positive Ca fluxes in the Ussing-Chamber were found in the duodenum. This may suggest the duodenum as the main site of active Ca absorption in the horse. Partially the Vitamin D receptor and Calbindin D9k were also detected in the hindgut of the horses, which possibly is involved in the regulation of the active Ca absorption when Ca is deficient. By means of Immunohistochemistry the Vitamin D receptor was mainly localised in the nucleus of the enterocytes predominantly in the crypts. Calbindin D9k on the other hand was mostly in the superficial epithelial layer.

Because the active intestinal Ca absorption depends on the amount of Ca in the feed, further studies with groups of different nutrition are suggested.

3 EINLEITUNG

Calcium (Ca) nimmt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase bei Wirbeltieren ein. Unter anderem ist es von Bedeutung für die Muskelkontraktion, die Blutgerinnung, die Übertragung von Nervenimpulsen, die Zelladhäsion und ist zusätzlich ein Bestandteil von Knochen. Für die Aufrechterhaltung einer konstanten Ca-Konzentration im Blut sind hauptsächlich die Hormone Parathormon (PTH), Calcitonin (CT) und Vitamin D (Vit D) verantwortlich. Unter bestimmten Bedingungen können weitere Hormone wie Kortikosteroide, Östrogene oder Thyroxin die Ca-Homöostase beeinflussen (Rosol und Capen, 1997).

Die Absorption von Ca im Darm findet über zwei verschiedene Wege statt. Der erste Prozess erfolgt passiv über die Tight junctions und ist somit parazellulär. Er findet auf der gesamten Länge des Darmtraktes statt und ist von der Ca-Konzentration im Darmlumen abhängig. Beim zweiten handelt es sich um einen aktiven, transzellulären Mechanismus, der von Vit D abhängig und in der Regel auf das Duodenum und proximale Jejunum beschränkt ist (Bronner et al., 1986). Die transzelluläre Ca-Aufnahme durch die Enterozyten wird in drei Schritte unterteilt: 1) Eintritt des Ca durch das apikale Plasmalemm über den Transient Receptor Potential Vanilloid Channel 6 (TRPV-6), 2) Intrazelluläre Diffusion des Ca gebunden an das Transportprotein Calbindin D9k (Calb9k), 3) Ausschleusung an der basolateralen Membran, hauptsächlich durch die Plasma-Membran-Ca-ATPase (PMCA) und in einem geringeren Ausmass durch den Natrium-Ca-Austauscher (NCX1) (Bronner, 2009). Diese drei Schritte werden alle über 1,25-Dihydroxycholecalciferol reguliert, indem die Genexpression von TRPV-6, Calb9k, PMCA und NCX1 über die Bindung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) im Nukleus des Enterozyten stimuliert wird (Hoenderop et al., 2005).

Untersuchungen bei Ratten haben gezeigt, dass die Gesamt-Ca-Aufnahme im Darmtrakt zu 90% im Dünndarm stattfindet. Obwohl die aktive Ca-Aufnahme im Duodenum am stärksten ausgeprägt ist, wird gesamthaft am meisten Ca im Ileum und etwas weniger im Jejunum aufgenommen (Marcus und Lengemann, 1962). Bei Hunden konnten ähnliche Verhältnisse nachgewiesen werden (Cramer, 1965). Die aktive Ca-Absorption tritt vor allem bei einer inadäquaten Ca-Versorgung in Erscheinung und kann anhand der Menge an VDR oder den an der aktiven Ca-Absorption beteiligten Proteine wie Calb9k abgeschätzt werden. So konnte gezeigt werden, dass die aktive Ca-Absorption bei Wiederkäuern, wie Schafen (Riner et al., 2008), Ziegen (Boos et al., 2007) und Kühen, (Liesegang et al., 2008) ebenfalls hauptsächlich

im Duodenum auftritt. Beim Kaninchen laufen die Fermentationsprozesse vorwiegend im Dickdarm, besonders im Caecum ab, so dass man auch von Dickdarm- oder genauer Caecumverdauern spricht (Breves et al., 2000). Die grössten Mengen an VDR und Calb9k wurden bei immunhistochemischen Untersuchungen an Kaninchen im Caecum gefunden, was auf eine hohe transzelluläre Ca-Aufnahme in diesem Darmabschnitt schliessen lässt (de Vries de Heekelingen, 2008).

Das Pferd gehört aufgrund der speziellen Verdauungsphysiologie ebenfalls zu den Dickdarmverdauern. Da die Fermentationsprozesse vorwiegend im Colon stattfinden, spricht man auch von einem Colonverdauer (Breves et al., 2000). Beim Pferd sind im Gegensatz zum Kaninchen, das mit Hilfe der Koprophagie für eine adäquate Ca-Aufnahme sorgt, keine besonderen Mechanismen zur Aufrechterhaltung ausreichender Ca-Konzentrationen bekannt. Des Weiteren existieren bis anhin nur wenige Daten über die Lokalisation der intestinalen Ca-Aufnahme beim Pferd.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Auswirkungen der speziellen Verdauungsphysiologie des Pferdes auf die intestinale Ca-Aufnahme in verschiedenen Darmabschnitten aufzuzeigen.

Für die vorliegende Studie wurden Darmproben von 10 gesunden Pferden mit unbekannter Fütterungsvorgeschichte untersucht. Für die Untersuchungen wurden Proben von Duodenum (DD), Jejunum (JE), Ileum (IL), Caecumkörper (CC), Colon ascendens ventrale Lage (CAV), Colon ascendens dorsale Lage (CAD) und Colon descendens (CD) entnommen.

Funktionelle Untersuchungen wurden mit der Ussing-Kammer-Methode durchgeführt. Die Verteilung der VDR und von Calb9k wurde durch die Erfassung der Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurden die VDR und Calb9k mittels Immunhistochemie in den verschiedenen Darmabschnitten nachgewiesen.

4 LITERATURÜBERISCHT

4.1 Topographie und Morphologie des Intestinaltraktes des Pferdes

4.1.1 Anatomie des Darmtraktes

Der Darmkanal wird stark vereinfacht in den engen Dünndarm (Intestinum tenue) und den in der Regel weiten Dickdarm (Intestinum crassum) eingeteilt. Beim Pferd ist insbesondere der Dickdarm mächtig ausgebildet, in dem sich beim Pferd die „Gärkammern“ befinden, welche die notwendigen Voraussetzungen für die Zelluloseverdauung bieten.

Der Dünndarm kann weiter in Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Hüftdarm) gegliedert werden.

Das Duodenum geht mit seiner Pars cranialis rechts der Medianebene aus dem Pylorus des Magens hervor. In diesem Bereich ist die Ampulla duodeni zu finden, wo sich die Einmündungen des Ductus choledochus und des Ductus pancreaticus auf der Papilla duodeni major und des Ductus pancreaticus accessorius auf der Papilla duodeni minor befinden. Über die Flexura duodeni cranialis geht die Pars cranialis in die Pars descendens über, die nach kaudodorsal aufsteigt. Die folgende Pars transversa geht kaudal des Blinddarmkopfes auf die linke Körperseite, um wieder nach kranial abzuknicken. Die Pars ascendens ist der letzte Abschnitt des Duodenums und verbindet sich durch die kurze Plica duodenocolica mit dem Colon transversum und dem Anfangsabschnitt des Colon descendens.

Auf die Pars ascendens des Duodenums folgt das sehr lange Jejunum, das an dem Mesojejunum, einer umfangreichen Gekröseplatte, befestigt ist. Die Schlingen des Jejunums können erhebliche Verschiebungen erfahren, sind aber vornehmlich im linken dorsalen Quadranten des Bauchraumes zu finden. Das Jejunum hat intrathorakal Kontakt zu Milz, Magen, Leber, Pankreas sowie Grimmdarmanteilen und kann sich des Weiteren zwischen linke und rechte Lagen des Colon ascendens einschieben.

Das Ileum hat je nach Kontraktionszustand eine Länge von 0,2 bis 0,7m und ist durch eine schon im mässig kontrahierten Zustand kräftig ausgebildete Muskelwand charakterisiert. Das Ileum ist durch die Plica ileocaecalis mit dem dorsalen Bandstreifen des Caecums verbunden. Als Grenze zwischen Jejunum und Ileum gilt das Ende des Gekrösestreifens, der sich als Fortsetzung der Plica ileocaecalis auf dem Ileum befindet. Über das Ostium ileale mündet das Ileum von medial her in die Basis caeci.

Die verschiedenen Abschnitte des Dickdarms haben eine sehr charakteristische Ausgestaltung und typische Lage in der Bauchhöhle. Zusätzlich entstehen durch die Zusammenraffung der Längsmuskulatur Bandstreifen, Taeniae, und die dazwischen gelegenen Poschen, Haustra. Der Dickdarm wird in Caecum (Blinddarm), Colon (Grimmdarm) und Rectum (Enddarm) eingeteilt.

Das Caecum besitzt im Mittel ein Fassungsvermögen von 33 l und eine Länge von durchschnittlich 1 m. Am Caecum unterscheidet man die Basis caeci (Blinddarmkopf) mit einer kleinen und einer grossen Krümmung, das Corpus caeci (Blinddarmkörper) und sein spitz auslaufendes Ende, den Apex caeci (Blinddarmspitze). Es sind vier Bandstreifen, Taeniae caeci, ausgebildet. Zusätzlich zur bereits erwähnten Plica ileocaecalis ist am lateralen Bandstreifen die Plica caecocolica ausgebildet, die den Kontakt zur rechten ventralen Längslage des Colon ascendens herstellt. Das Ostium caecocolicum verbindet den Blinddarmkopf mit dem Grimmdarm und wird von zwei kräftigen Schleimhautfalten, Valvae caecocolicae, umgeben.

Das Colon besteht aus dem mächtigen Colon ascendens, dem kurzen, vor der Gekrösewurzel verlaufenden Colon transversum und dem relativ langen Colon descendens.

Das Colon ascendens bildet eine grosse, U-förmige Schleife, deren Anfang und Ende der Gekrösewurzel benachbart und durch das zwischen die Schenkel ziehende Mesocolon ascendens befestigt sind. Die Grimmdarmschleife zieht von rechts über kranial am Zwerchfell vorbei nach links und legt sich zu einem doppelten U-Rohr zusammen. Somit werden die ventralen und die dorsalen Kolonlagen unterschieden sowie die dazwischen gelegene Flexura pelvina. Im rechten Teil des dorsalen Colon ist das Lumen von einer erheblichen Weite und wird deshalb „magenähnliche Erweiterung“, Ampulla coli, genannt.

Der Übergang in das enge Colon transversum erfolgt rechts der Gekrösewurzel. Es handelt sich dabei um ein kurzes Darmstück, das vor der Gekrösewurzel von rechts nach links zieht und dabei mit dem Pankreas, der dorsalen Bauchwand sowie der Gekrösewurzel verbunden ist.

Das folgende Colon descendens erreicht eine Länge von 2,5-4 m, ist im Vergleich zum Colon ascendens relativ eng und hängt an einer langen Gekröseplatte, Mesocolon descendens. Seine Schlingen befinden sich wie die Leerdarmschlingen im linken dorsalen Quadranten der Bauchhöhle und sind leicht verschieblich. Charakteristisch für das Colon descendens sind zwei durchlaufende, ausserordentlich kräftige Bandstreifen.

In Höhe des Beckeneingangs findet der Übergang in das Rectum statt, welches eine Länge von 0,2-0,3 m hat und im peritonealen Teil der Beckenhöhle am Mesorectum hängt. Vor dem Übergang in den Afterkanal ist eine Erweiterung zur stark muskulösen und geräumigen Mastdarmampulle, Ampulla recti zu finden. (Vollmerhaus und Roos, 2004)

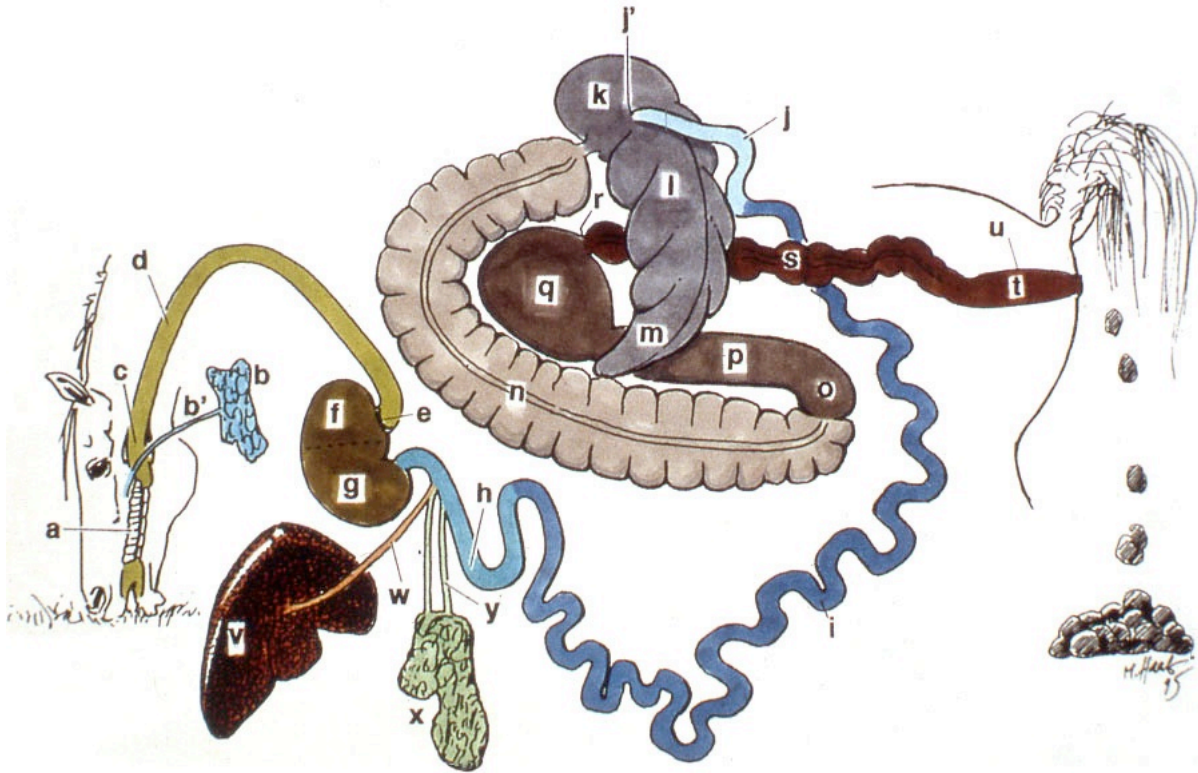


Abbildung 1: Verdauungsapparat des Pferdes (M. Heeb): a=Mundhöhle, Cavum oris; b=Grosse Kopfspeicheldrüse, Glandula parotis; b'= Gemeinsamer Ausführungsgang der Parotis, Ductus parotideus; c=Pars oesophagea pharyngis; d=Speiseröhre, Ösophagus; e=Mageneingang, Cardia; f=kutane, drüsenlose Schleimhaut des Magens; g=Drüsenzzone (Fundus- und Pylorusdrüsenzzone) des Magens; h=Zwölffingerdarm, Duodenum; i=Leerdarm, Jejunum; j=Hüftdarm, Ileum; j'=Ostium ileale ; k=Blinddarmkopf, Basis caeci ; l=Blinddarmkörper, Corpus caeci; m=Blinddarmspitze, Apex caeci; n=Colon ascendens, ventrale Lage; o=Beckenflexur; p=Colon ascendens, dorsale Lage mit der „magenähnlichen Erweiterung“, Ampulla coli (q); r=Colon transversum; s=Colon descendens; t=Rectum ; u=Ampulla recti; v=Leber, Hepar; w=Ductus choledochus; x=Pankreas; y=Ductus pancreaticus accessorius

4.1.2 Histomorphologie des Darmtraktes

Die Wand des Darmkanals ist nach einem einheitlichen Bauprinzip aufgebaut. Es werden die Schleimhaut (Tunica mucosa), die Unterschleimhaut (Tela submucosa), die Muskulatur (Tunica muscularis), die Bindegewebsschicht (Tunica adventitia) oder die Serosa (Tunica serosa) unterschieden. Je nach Darmabschnitt treten lokale Modifikationen auf (Weyrauch und Smollich, 2009).

4.1.2.1 Tunica mucosa

Die Tunica mucosa kann weiter in das Schleimhautepithel (Lamina epithelialis mucosae), das Schleimhautbindegewebe (Lamina propria mucosae) und die Schleimhautmuskulatur (Lamina muscularis mucosae) unterteilt werden (Weyrauch und Smollich, 2009).

Die Lamina epithelialis mucosae bildet die innerste Schicht des Darmkanals und besteht aus einem einschichtig-hochprismatischen Epithel, ausser im Bereich des Anus, wo ein mehrschichtiges Plattenepithel vorhanden ist (Mosimann und Kohler, 1990). Das einschichtig-hochprismatische Epithel besteht aus den Saumzellen, die lumenseitig einen Bürstensaum aus Mikrovilli tragen, und den Becherzellen, welche Schleimgranula in ihrem Zellleib ansammeln und ans Lumen abgeben. Daneben kommen im Dünndarm Lysozym-sezernierende Paneth-Zellen und endokrine Zellen vor (Mosimann und Kohler, 1990).

Es folgt die Lamina propria mucosae aus lockerem Bindegewebe als Grundlage für die Darmzotten und die Darmdrüsen (Glandulae intestinales, Krypten, Lieberkühn-Drüsen). Daneben kommen noch Blut- und Lymphgefässe, Nervenfasern sowie Immunzellen und lymphoretikuläres Gewebe vor (Liebich, 2010).

Die dritte Schicht der Tunica mucosa ist die Lamina muscularis mucosae, die aus spiralförmig verlaufenden glatten Muskelzellen besteht und die Grenze zwischen Tunica mucosa und Tela submucosa darstellt (Junqueira und Carneiro, 1991).

Um die resorptive Oberfläche zu vergrössern sind im Dünndarm Schleimhautfalten (Plicae circulares) vorhanden, die immer von der Lamina muscularis mucosae begleitet werden. Eine weitere Vergrösserung der Epithelfläche findet durch die Darmzotten (Villi intestinales) statt. Dabei handelt es sich um 0,4 bis 1 mm lange und 100 bis 150 µm dicke Schleimhautvorsprünge (Mosimann und Kohler, 1990). In sämtlichen Abschnitten des Dickdarmes fehlen Darmzotten (Liebich, 2010).

4.1.2.2 Tela submucosa

Die Unterschleimhaut (Tela submucosa) besteht aus lockerem Bindegewebe und stellt funktionell die wichtigste Verschiebeschicht der Darmwand dar. Diese Schicht ist reich vaskularisiert und enthält einen vegetativen Nervenplexus (Plexus submucosus, Meissner-Plexus) (Mosimann und Kohler, 1990). Daneben kommen Einzellymphknötchen (Noduli lymphatici solitarii) und aggregierte Lymphknötchen (Noduli lymphatici aggregati, Peyer-Platten) stellenweise gehäuft vor. Typisch für die Tela submucosa des Duodenums ist das Auftreten von Glandulae submucosae (Brunner-Drüsen), die bei den Haussäugetieren meist verzweigt und tubuloazinär sind (Liebich, 2010).

4.1.2.3 Tunica muscularis

Die Muskelschicht (Tunica muscularis) wird in eine innere Schicht, Stratum circulare, und eine äussere Schicht, Stratum longitudinale eingeteilt. Dazwischen befindet sich eine schmale Bindegewebszone mit Blut- und Lymphgefässen sowie dem autonomen Plexus myentericus (Auerbach Plexus) (Mosimann und Kohler, 1990).

4.1.2.4 Tunica adventitia / Tunica serosa

Die Tunica adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe und sorgt für den festen Einbau des betreffenden Darmabschnitts in die Umgebung. In dieser Schicht liegt je nach Abschnitt unterschiedlich viel Fettgewebe und Gefässe sowie Nerven für die Versorgung des Darmes verlaufen darin. Die Tunica adventitia tritt in den zölonfreien Körperregionen (Becken) als äusserste Schicht des Verdauungskanals in Erscheinung (Liebich, 2010). Dort wo eine Abgrenzung gegenüber einer Körperhöhle (Brust-, Bauch-, Beckenhöhle) besteht, ist eine Tunica serosa vorhanden. Diese lässt sich unterteilen in eine Lamina epithelialis serosae aus einem einschichtigen Plattenepithel, auch Mesothel genannt, und einer darunter liegenden Lamina propria serosae, welche auch elastische Fasern enthält (Mosimann und Kohler, 1990). Die Lamina epithelialis serosae kann Stoffe aus den Körperhöhlen durch Pinozytose und Phagozytose aufnehmen und seröse Flüssigkeiten sezernieren (Liebich, 2010). Des weiteren ist sie durch ihre glatte Oberfläche für die Verschieblichkeit des Darmes gegenüber benachbarten Strukturen, bzw. Organen verantwortlich (Mosimann und Kohler, 1990).

4.1.3 Verdauungsphysiologie des Pferdes

Im Dünndarm werden die komplexen Moleküle vor der Resorption in niedermolekulare Verbindungen gespalten (Penzlin, 2005). Dies geschieht durch Verdauungssekrete aus der

Bauchspeicheldrüse (Pankreas), der Galle und der Darmschleimhaut selber. Nahrungskohlenhydrate wie Stärke, Saccharose und Lactose werden durch Amylase aus dem Pankreas sowie Di- und Oligosaccharidasen aus dem Dünndarmepithel verdaut. Weil die Strukturkohlenhydrate, z.B. Cellulose, Hemicellulose und Pectin, von diesen Enzymen nicht angegriffen werden, kommt es im Dickdarm des Pferdes zu einem mikrobiellen Abbau, bei dem kurzkettige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure) entstehen. Proteine werden durch Endo- und Exopeptidasen in kurzkettige Peptide und Aminosäuren abgebaut, welche von der Dünndarmschleimhaut durch sekundär aktiven Transport resorbiert werden. Fette kommen im Futter überwiegend in Form von Triglyceriden vor, welche bereits im Magen durch die linguale und gastrale Lipase vorverdaut werden und im Dünndarm durch die pankreatische Lipase zu β -Monoglyceriden und Fettsäuren hydrolysiert werden. Eine Voraussetzung für die Lipasewirkung ist die Anwesenheit von konjugierten Gallensäuren (Breves et al., 2000). Zusammen mit Wasser, Elektrolyten und Vitaminen werden die niedermolekularen Endprodukte von der Dünndarmschleimhaut resorbiert.

Der Dickdarm des Pferdes ist als grosse Fermentationskammer besonders mächtig ausgebildet und dient sowohl mikrobiellen Syntheseleistungen wie auch dem transepithelialen Transport von Wasser, Elektrolyten und den Endprodukten des mikrobiellen Stoffwechsels. Da beim Pferd das Colon eine zentrale Rolle für diese Fermentationsprozesse spielt, wird auch der Begriff „Colonverdauung“ verwendet. Die Mikroorganismen produzieren Enzyme, welche die β -glykosidischen Bindungen der Cellulose spalten, wodurch letztendlich niedermolekulare Fettsäuren entstehen, die über das Darmepithel resorbiert werden (Breves et al., 2000). Das mikrobielle Eiweiss kann vom Pferd – im Gegensatz zum Vormagenverdauung – nicht mehr verdaut werden und wird mit dem Kot ausgeschieden (Penzlin, 2005).

4.2 Calcium-Metabolismus des Pferdes

Ca ist ein Mengenelement von zentraler Bedeutung für diverse Prozesse bei Säugetieren, wie z.B. Muskelkontraktion, Blutgerinnung, Enzymaktivierung, Übertragung von Nervenimpulsen sowie Hormonsekretion und ist zusätzlich ein essentieller Bestandteil des Knochengewebes. Die grundlegenden Funktionen des Ca können somit in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Knochen und Zähnen, 2) Wirkung als Boten- oder regulatorisches Ion. Die Signalfunktion von Ca wird ermöglicht durch den starken Konzentrationsgradienten zwischen extrazellulärer Flüssigkeit und

Zytoplasma. Der Ca-Einstrom wird über potentialabhängige Ca-Kanäle reguliert, wodurch intrazelluläre Prozesse aktiviert werden (Rosol und Capen, 1997).

Der Körper von Wirbeltieren enthält ungefähr 2% Ca, wobei sich 99% des Ca im Knochen und nur 1% in den Weichgeweben befinden. Im Knochen liegen 99,5% des Ca gebunden an Phosphor als Hydroxyapatitkristalle ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}_2]$) vor (Sykes und Russel, 2007). Diese Kristalle sind einerseits für die Festigkeit des Knochens verantwortlich und dienen andererseits als reversibler Speicher, um je nach Bedarf Ca einzulagern oder zu mobilisieren (Oberleitner, 1996). Nur ca. 0,5% des Ca im Knochen ist in den Flüssigkeiten gelöst und somit schnell mobilisierbar (Kaune, 2000).

Eine ausreichende Ca-Aufnahme ist beim Pferd von der Menge an Ca im Futter abhängig. Da der extrazelluläre Ca-Gehalt von verschiedenen Faktoren abhängig ist, kann die Serum-Ca-Konzentration nicht als Indikator für eine ausreichende Ca-Aufnahme verwendet werden. Verglichen mit Wiederkäuern absorbieren Pferde einen grösseren Anteil des Ca aus ihrem Futter. Die Ca-Aufnahme ist sehr effizient und nur wenig vom Alter abhängig. Weitere Besonderheiten beim Ca-Metabolismus des Pferdes sind der hohe Ca-Spiegel im Serum, trotz tiefen Konzentrationen an Vit D-Metaboliten und eine hohe Ausscheidungsrate von Ca über die Niere. Auch scheint die intestinale Ca-Absorption beim Pferd nur schwach kontrolliert zu sein (Toribio, 2004).

4.2.1 Calcium-Absorption bei Säugetieren

Die Ca-Absorption findet über die Epithelien der Nierentubuli, des Darmtraktes, der Plazenta, der Milchdrüse und bei Fischen zusätzlich über die Kiemen statt (Hoenderop et al., 2005). Im folgenden Teil soll lediglich die intestinale Ca-Aufnahme besprochen werden, da sich die vorliegende Arbeit auf diesen Bereich beschränkt.

Ca wird im Darm sowohl resorbiert als auch mit den Verdauungssäften ins Darmlumen sezerniert, der Ca-Transport im Darm ist somit ein bidirektionaler Prozess (Scharrer und Wolfram, 2000). Die intestinale Ca-Absorption geschieht auf zwei voneinander unabhängigen Wegen (siehe Abbildung 2). Beim ersten handelt es sich um einen aktiven, transzellulären Prozess, der durch Vit D reguliert wird und sättigbar ist. Bei den meisten Säugetieren tritt er vorwiegend im Duodenum und proximalen Jejunum bei niedrigen lumenseitigen Ca-Konzentrationen auf. Der zweite Weg findet passiv und parazellulär statt, ist von der Ca-Konzentration im Darmlumen abhängig und somit nicht sättigbar. Er dominiert bei grossen lumenseitigen Ca-Konzentrationen und kann im gesamten Dünndarm auftreten, wobei das Ileum aufgrund der langen Verweildauer des Darminhalts die Hauptrolle spielt (Bronner,

1987; Bronner, 2003). Die Ca-Absorption des Pferdes ist stärker vom Ca-Gehalt im Futter abhängig als von den metabolischen Bedürfnissen, was darauf hindeutet, dass der parazelluläre Ca-Transport von grösserer Bedeutung ist als bei anderen Spezies (Rourke et al., 2010).

4.2.1.1 Transzellulärer Transport

Die aktive, transzelluläre Ca-Aufnahme wird in drei aufeinander folgende Schritte eingeteilt:

A) Ca-Eintritt

Eintritt von luminalem Ca in den Enterozyten über Ca-spezifische Membrankanäle (Typ TRPV5 und TRPV6) in der Bürstensaummembran (Hoenderop et al., 2005). Die Aufnahme in das Zytoplasma ist ein passiver Prozess, der durch einen starken elektrochemischen Gradienten aufrechterhalten wird, da die Konzentration an freiem Ca im Zytoplasma sehr gering ist ($< 1 \mu\text{mol/l}$). Die Bindung von Calcitriol an die intrazellulär gelegenen Vit D-Rezeptoren vermittelt die Öffnung dieser Kanäle (Oberleitner, 1996).

B) Ca-Transport durch das Zytosol

Eine starke Erhöhung des intrazellulären Ca ist für die Zelle toxisch. Deshalb kann der Ca-Transport durch die Enterozyten nicht in Form des freien Ca stattfinden. Es gibt zurzeit zwei verschiedene Modelle, um den Ca-Transport von der luminalen zur basolateralen Membran zu erklären. Beim ersten wird das freie Ca reversibel an ein Vit D-abhängiges Protein, Calb9k, gebunden. Das zweite Modell geht davon aus, dass die Enterozyten Lysosomen bilden, in welche das freie Ca eingeschlossen und so zur basolateralen Membran transportiert wird (Hoenderop et al., 2005; Khanal und Nemere, 2008)

C) Ca-Ausschleusung

Bei der Ausschleusung von Ca auf der basolateralen Seite handelt es sich im Gegensatz zur luminalen Aufnahme um einen energieabhängigen Prozess, der gegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgt. Diese Aufgabe wird hauptsächlich von einer ATP-abhängigen Ca-Pumpe (Plasma-Membran-Ca-ATPase; PMCA) übernommen, die gegen einen 1000-fachen Konzentrationsgradienten arbeitet. Daneben befindet sich in der basolateralen Membran ein Natrium/Ca-Austauscher (NCX1), wobei dieser nur ca. 20% der Kapazität der Ca-ATPase erreicht (Wasserman et al., 1992).

Das Vit D-Hormon Calcitriol (1,25-dihydroxy-Vitamin D₃) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der aktiven Ca-Absorption im Darm. Es beeinflusst über die Bindung an den intrazellulären VDR die Genexpression von Calb9k und TRPV5/6. Der Effekt auf die basolateral gelegene Ca-ATPase und den Na/Ca-Austauscher ist noch nicht vollständig

geklärt (Hoenderop et al., 2005). Eine genauere Betrachtung von Vit D und des VDR wird im Kapitel 4.3 vorgenommen.

4.2.1.2 Parazellulärer Transport

Das Darmepithel besteht aus einer kontinuierlichen Schicht von einzelnen Enterozyten mit sehr engen Zwischenräumen zwischen den Zellen, über die eine Diffusion von kleinen Molekülen und Ionen wie z.B. Ca möglich ist. Dieser passive Prozess wird als parazellulärer Weg bezeichnet. Als Barriere dienen interzelluläre Strukturen, die Tight junctions, welche sowohl die Diffusion von Flüssigkeiten als auch von Membranlipiden und –proteinen einschränken. Die Ca-Ionen diffundieren vom Darmlumen über die Tight junctions zunächst in die Interstitialflüssigkeit und anschließend ins Blut. Die Diffusionsrate hängt einerseits von der Ca-Konzentration im Lumen und andererseits vom elektrischen Gradienten des Epithels ab. Hormone und den elektrochemischen Gradienten beeinflussende Faktoren können so einen indirekten Einfluss auf den passiven Transport über die Tight junctions haben. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Bakterientoxine und weitere modulierende Stoffe können die Permeabilität der Tight junctions ebenfalls beeinflussen (Hoenderop et al., 2005).

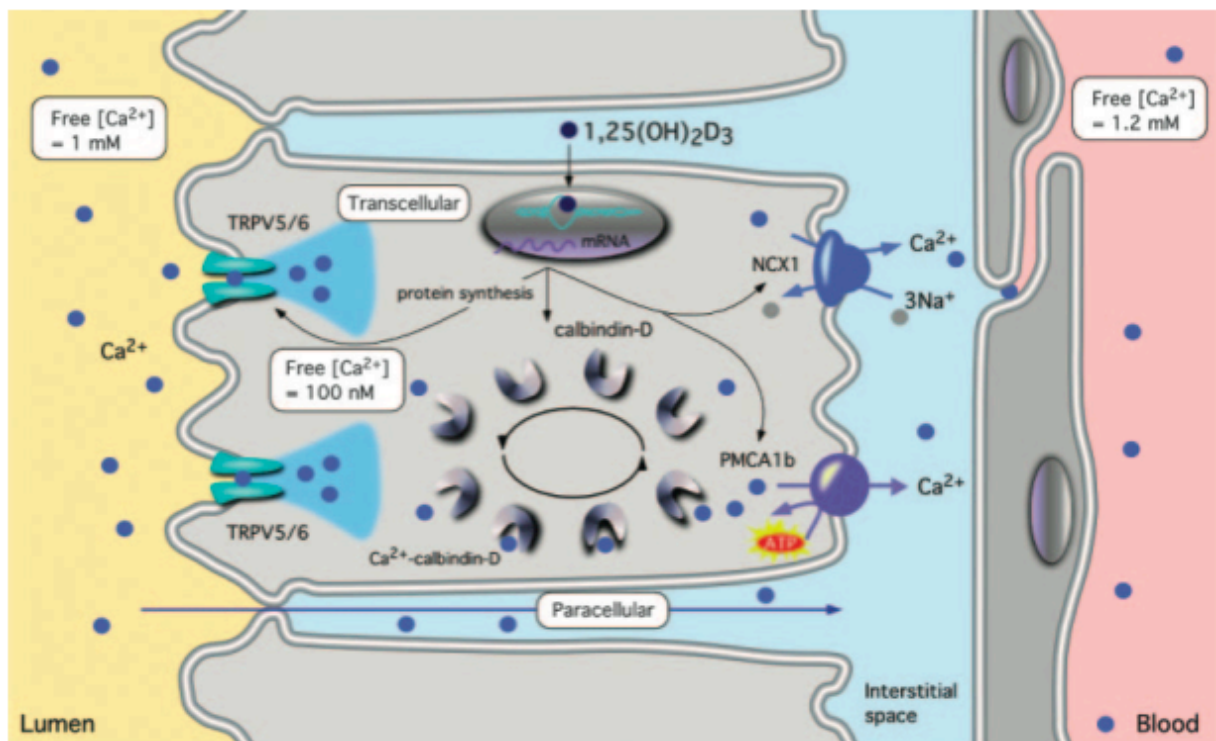


Abbildung 2: Mechanismen der aktiven transzellulären und passiven parazellulären Absorption von Ca im Darm (Hoenderop et al., 2005): Der parazelluläre Ca-Transport findet über die Tight Junctions statt und wird von einem elektrochemischen Gradienten für Ca angetrieben. Vit D $_3$ (1,25(OH) $_2$ D $_3$) stimuliert die einzelnen Schritte der transzellulären Ca-

Aufnahme, indem es die Expression der luminalen Ca-Kanäle (TRPV 5/6), von Calb9k (calbindin-D) und der basolateralen Ausschleusungssysteme (PMCA1b, NCX1) stimuliert.

4.2.2 Calcium-Konzentration im Blut des Pferdes

Ca ist das am reichlichsten vorhandene extrazelluläre, zweiwertige Kation und seine Konzentration im Blut wird in engen Grenzen reguliert. Bei adulten Pferden liegt sie im Schnitt bei $3,23 \pm 0,16$ mmol/l (Berlin und Aroch, 2009) und ist verglichen mit der anderer Tierarten, bei denen sie im Mittel bei etwa 2,5 mmol/l liegt, etwas höher (Hoenderop et al., 2005). Beim Kaninchen, das ebenfalls ein Dickdarmverdauungstier ist und ein mit Pferden vergleichbaren Ca-Stoffwechsel aufweist, wurden ebenfalls höhere Gesamtcalciumwerte von $3,23 \pm 0,25$ mmol/l gemessen (Warren et al., 1989). Im Blut liegt Ca in drei verschiedenen Formen vor: 1) 50-55 % in Form von freiem ionisiertem Ca, welches die biologisch aktive Form darstellt, 2) 40-45 % gebunden an Proteine, v.a. an Albumin, 3) 5-10 % in Form von Komplexen mit kleinen Anionen, z.B. Laktat, Phosphat, Bikarbonat. Die Ca-Konzentrationen werden vom Alter, der Trächtigkeit, der Laktation und der Fütterung beeinflusst (Berlin und Aroch, 2009).

4.2.3 Calcium-Ausscheidung

Calcium wird beim Pferd hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden, daneben aber auch über Kot und Schweiss. Bei trächtigen Stuten wird Ca zusätzlich über die Plazenta und den Uterus an den Föten abgegeben, bzw. bei laktierenden Stuten über die Milch. Weil Pferde einen grösseren Anteil an Ca aus ihrer Nahrung absorbieren als Wiederkäuer, enthält ihr Kot eine tiefere Konzentration an Ca und ein tieferes Ca:P-Verhältnis (Schryver et al., 1974; Schryver et al., 1983). Die Menge an ausgeschiedenem Ca hängt vom physiologischen Zustand des Pferdes, der Menge des aufgenommenen Ca, der Anwesenheit von mit der Ca-Absorption interferierenden Substanzen und allfälligen Krankheiten ab. Wenn Pferde eine gleiche Menge an Ca und Phosphor erhalten, übersteigt die Ausscheidungsrate von Ca diejenige des Phosphors im Urin. Die Urin-Clearance, wie auch das Verhältnis von Ca im Urin und im Blut können verwendet werden, um die Ca-Aufnahme abzuschätzen (Caple et al., 1982).

4.2.4 Regulation des Calcium-Stoffwechsels

Die drei wichtigsten Hormone für die Regulation der Ca-Homöostase sind das Parathormon (PTH) aus den Hauptzellen der Nebenschilddrüse, das Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), das vom

Säuger selbst synthetisiert oder mit der Nahrung aufgenommen werden kann und das Calcitonin (CT) aus den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse. Daneben können weitere Hormone, wie Geschlechtshormone, Kortikosteroide, Thyroxin und Somatotropin, einen Einfluss auf den Ca-Stoffwechsel ausüben. Die Einwirkung dieser Hormone auf den Ca-Stoffwechsel findet über eine Beeinflussung der intestinalen Absorption, der renalen Sekretion bzw. Reabsorption und der Mobilisation aus sowie dem Einbau in den Knochen statt (Kraft et al., 2005)(siehe Abbildung 3). Beim Pferd soll der intestinale Ca-Transport schlechter reguliert und weniger stark von Vitamin D₃ abhängig sein als bei anderen Spezies (Breidenbach et al., 1998; Rourke et al., 2010).

4.2.4.1 Parathormon (PTH)

PTH ist ein Peptidhormon aus 84 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 25-34 wichtig sind für die Bindung an den Rezeptor der Zielzellen und die Aminosäuren 1-7 für seine Aktivierung. Somit enthält das Fragment PTH(1-34) alle für die biologische Wirkung wichtigen Abschnitte (Kaune, 2000). Einen Abfall des ionisierten Ca im Plasma nehmen die Hauptzellen der Nebenschilddrüse über Ca-sensitive Rezeptoren wahr, worauf sie PTH bilden und in die Blutzirkulation ausschütten. Das PTH führt primär über eine Bindung an die PTH/PTHrP-Rezeptoren in der Niere und im Knochen zu einer Steigerung der tubulären Ca-Rückresorption und der tubulären Phosphat-Ausscheidung sowie zu einer Mobilisierung von Ca und Phosphat aus dem Knochen. Weiter wird in der Niere über eine Aktivierung der 1 α -Hydroxylase die Bildung von Calcitriol, der aktiven Form von Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) aus dessen Vorstufe 25(OH)D₃ stimuliert (Hoenderop et al., 2005). Als Folge dieser Mechanismen wird der Blut-Ca-Wert wieder normalisiert, wobei eine nachfolgende minime Zunahme der Plasma-Ca-Konzentration sich wiederum in einer negativen Rückkoppelung auf die PTH-Sekretion auswirkt.

4.2.4.2 Calcitriol (1,25(OH)₂D₃)

Calcitriol ist der wichtigste aktive Metabolit des Vitamin D₃ und dient der Erhaltung der Ca- und Phosphor-Konzentrationen im Blut, die für die Mineralisierung des Knochens verantwortlich sind. Biologisch aktiv ist jedoch nur der freie Teil (ca.1%). Der Rest liegt gebunden an spezifische Bindungsproteine oder Albumin vor. Es kommt als Folge einer Vitamin D₃-Wirkung zu einer Erhöhung von Ca und Phosphor im Plasma durch eine Steigerung der Ca- und Phosphor-Absorption im Darm sowie durch eine zunehmende Ca-Rückresorption in den Nieren. Weiter kann Calcitriol zusammen mit PTH Ca und Phosphor

aus dem Knochen mobilisieren, indem es die Kollagensynthese der Osteoblasten senkt und die Bildung von Osteoklasten fördert (Kaune, 2000). Weitere Informationen über den Metabolismus und den Wirkungsmechanismus von Vitamin D sind dem Kapitel 4.3 zu entnehmen.

4.2.4.3 Calcitonin (CT)

CT ist ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren und wird bei einer Hypercalcämie in den C-Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet. Seine Rezeptoren besitzen die Fähigkeit, die Osteoklasten-mediierte Knochenresorption zu regulieren (Hoenderop et al., 2005). Da die Hauptaufgabe des CT in einer Senkung des Blut-Ca-Spiegels besteht, handelt es sich in gewisser Weise um einen Antagonisten zu PTH. Auf der anderen Seite sind die Effekte, verglichen mit jenen von PTH oder CT, eher gering. Im Knochen hemmt CT die Osteoklasten und fördert die Proliferation der Osteoblasten, was zu einer vermehrten Einlagerung von Ca führt. Ein direkter Effekt von CT auf die Niere ist noch nicht vollständig geklärt, obwohl CT-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. (Kaune, 2000). Die Ca-Absorption im Darm wird von CT nicht beeinflusst (Kraft et al., 2005).

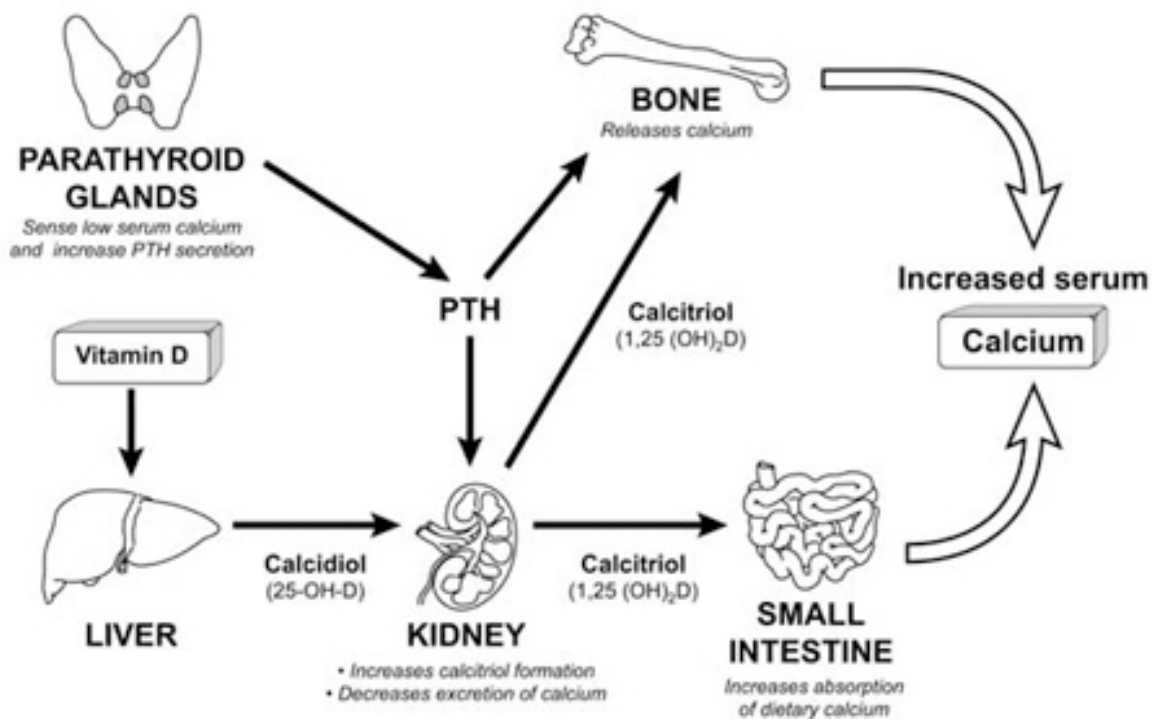


Abbildung 3: Regulation der Ca-Homöostase (Linus Pauling Institute: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/calcium/capth.html>): Bei einem niedrigen Serum-Ca-Level sezerniert die Nebenschilddrüse PTH, welches in der Niere die Aktivität der

1 α -Hydroxylase stimuliert und somit zu einer erhöhten Produktion von Calcitriol führt. In der Niere wird Calcitriol durch eine Hydroxylierung von Calcidiol gebildet, welches bereits in der Leber durch eine Hydroxylierung von Vitamin D entstanden ist. Calcitriol führt über drei Wege zu einer Normalisierung des Serum-Ca-Levels: 1) Aktivierung der aktiven Ca-Aufnahme im Dünndarm, 2) Erhöhung der Ca-Mobilisation aus dem Knochen, 3) Erhöhung der Reabsorption von Ca in den Nieren. Für die Ca-Mobilisation aus dem Knochen und die Reabsorption von Ca in den Nieren ist zusätzlich die Wirkung von PTH erforderlich.

4.3 Vitamin D

4.3.1 Begriffsdefinitionen zum Vitamin D

Unter dem Begriff Vit D werden verschiedene Stoffe (Steroide) zusammengefasst, die auch Calciferole genannt und zu den fettlöslichen Vitaminen gezählt werden, aber im Hinblick auf ihre Wirkungsweise den Hormonen zuzuschreiben sind. De Luca (DeLuca, 1982) schlägt deshalb den Begriff „Prohormon“ vor, weil der Organismus die Fähigkeit zur Eigensynthese von Vit D besitzt und dieses über zytosolische Rezeptorproteine unmittelbar am Zellkern angreift. Die wichtigsten Vertreter sind Ergocalciferol (= Vit D₂) und Cholecalciferol (=Vit D₃), welche bei den meisten Säugetieren dieselbe biologische Aktivität besitzen (Horst et al., 1994). Der einzige strukturelle Unterschied zwischen Vit D₂ und Vit D₃ besteht in den unterschiedlichen Seitenketten, wobei Vit D₂ zusätzlich eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23 sowie eine Methylgruppe an C-24 besitzt (Holick, 2003). In der Abbildung 4 sind die beiden Vorstufen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol und ihre anschliessende Synthese unter der Einwirkung von Sonnenlicht zu den Hormonen Vit D₂ und D₃ dargestellt. In der Nahrung kommt Vit D₂ hauptsächlich in Pflanzen vor, teilweise als Ergocalciferol, häufiger aber als dessen Vorstufe Ergosterol. Die Versorgung mit Vit D₃ erfolgt entweder ebenfalls durch Zufuhr mit der Nahrung (als Cholecalciferol oder als Provitamin 7-Dehydrocholesterol in tierischen Geweben) oder durch Eigensynthese in der Haut aus in der Leber gebildetem 7-Dehydrocholesterol. Das mit der Nahrung aufgenommene Provitamin 7-Dehydrocholesterol muss ebenfalls durch UV-Bestrahlung in der Haut in Vit D₃ umgewandelt werden (Kaune, 2000).

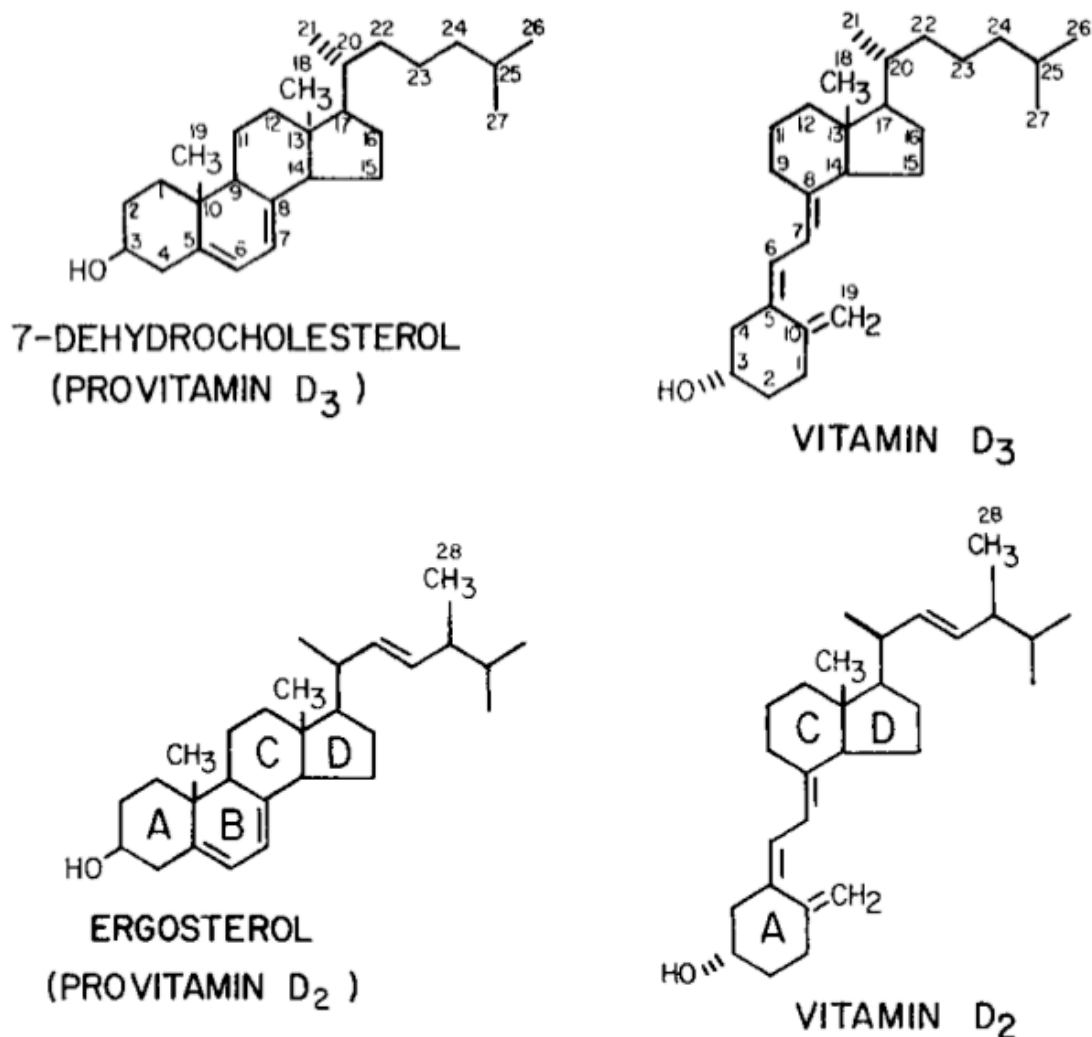


Abbildung 4: Vitamine D₂ und D₃ mit den entsprechenden Vorstufen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol (Holick, 2003)

4.3.2 Biotransformation von Vitamin D

Das in der Haut gebildete oder mit der Nahrung aufgenommene Vit D₃ wird ans Blut abgegeben und mittels Chylomikronen zur Leber transportiert. In der Leber findet eine erste Hydroxylierung am C25 zum 25(OH)D₃ (Calcidiol) statt. Dieses wird an das Vit D-Bindungsprotein (DBP) gebunden zur Niere transportiert und am C1 zur aktiven Form 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol, Vitamin D-Hormon) hydroxyliert. Die Aktivität der 1- α -Hydroxylase der Niere ist im Gegensatz zur 25-Hydroxylase in der Leber streng reguliert. PTH sowie sinkende Ca- und P-Konzentrationen im Blut stimulieren deren Aktivität, während diese durch 1,25(OH)₂D₃ selbst gehemmt wird. Wenn die stimulierenden Signale fehlen, so erfolgt die Hydroxylierung am C24 zu 24,25(OH)₂D₃, einem Metaboliten mit noch weitgehend ungeklärter Funktion (Kaune, 2000).

4.3.3 Wirkungsmechanismus von Vitamin D

Vit D-Metaboliten sind lipophile Moleküle mit einer geringen Wasserlöslichkeit und werden deshalb im Blut an Plasmaproteine gebunden transportiert. Neben dem Vit D-Bindungsprotein (DBP) als wichtigstem Transportprotein sind auch Albumine und Lipoproteine von Bedeutung (Norman et al., 1992; Dusso et al., 2005). Nur etwa 5% der Vit D-Hormone sind ungebunden und gelangen wegen ihrer lipophilen Eigenschaften mittels einfacher Diffusion in die Zellen. Weil die Protein-gebundenen Vitamin D-Metaboliten im Blut an der Diffusion gehindert werden, ist ihre Anfälligkeit für den hepatischen Stoffwechsel und somit auch die biliäre Ausscheidung verringert. Dadurch ist die Halbwertszeit von Vit D-Metaboliten im Blut verlängert (Dusso et al., 2005).

Das freie Vit D₃ bindet an die spezifischen Vit D-Rezeptoren, die im Zellkern der Zielzelle lokalisiert sind und die zu aktiven Transkriptionsfaktoren werden, wenn das Hormon bindet (siehe Kapitel 4.4). Im Darm wird die Ca-Absorption durch eine gesteigerte Expression der epithelialen Ca-Kanäle TRPV 5 und 6, des cytosolischen Transportproteins Calb9k und wahrscheinlich auch der membranständigen Calcium-ATPase (PMCA) stimuliert. In der Niere erfolgt die Stimulierung über die gesteigerte Expression des Natrium-Ca-Austauschers (NCX1), wobei gleichzeitig die renale Exkretion gehemmt wird (Hoenderop et al., 2005). Im Knochen ist die Wirkung von Vit D₃ abhängig von der alimentären Ca-Aufnahme und von CT. Bei einer adäquaten Ca-Versorgung fördert Vit D₃ die Mineralisierung der Knochen durch eine Erhöhung der Ca-Konzentration im Blut und eine Hemmung von PTH. Ist die Ca-Versorgung aber ungenügend, so unterstützt Vit D₃ die Ca-mobilisierende Wirkung des PTH. Somit wird das Vit D-System sowohl für anabole wie auch katabole Effekte auf den Knochenstoffwechsel benötigt (Panda et al., 2004).

4.4 Vitamin D-Rezeptor

4.4.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

1,25(OH)₂D₃ ist als Steroidhormon ein lipophiler Ligand, der frei in die Zielzelle diffundieren kann und im Zellkern an einen DNA-assoziierten Rezeptor bindet (Haussler et al., 1988). Neben dem nukleären Rezeptor für 1,25(OH)₂D₃ (VDR_{nuc}) existieren auch Rezeptoren in der Zellmembran (VDR_{mem}). Vit D und alle seine Metaboliten, wie das 1,25(OH)₂D₃, können im Gegensatz zu anderen Steroidhormonen verschiedene Konformationen annehmen. Nimmt das 1,25(OH)₂D₃ die 6-s-trans-Form an, so wird der VDR_{nuc} aktiviert, was in einer gesteigerten Synthese von Vit D-abhängigen Proteinen wie Calb9k, TRPV 5/6 und wahrscheinlich auch

der PMCA resultiert. Der VDR_{mem} hingegen bindet die 6-s-cis-Form des 1,25(OH)₂D₃ und ist für die Aktivierung von Enzymen verantwortlich (Norman et al., 2001). Während der Reaktionsweg über den VDR_{mem} ein schneller Prozess ist (rapid response; Sekunden bis Minuten), ist die Aktivierung des VDR_{nuc} eine langsame genomische Antwort (genomic response; 60 Minuten bis Stunden) (Norman, 2006).

Bei den Säugetieren liegt das Molekulargewicht des VDR zwischen 48 kDa und 55 kDa. Bei Vögeln ist der VDR mit einem Molekulargewicht von 60 kDa grösser, aber in Bezug auf die biochemischen Eigenschaften weitgehend ähnlich (Haussler, 1986; Riner, 2006). Beim Vergleich der Molekülgrösse des VDR von Vögeln und Säugetieren wird ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der molekularen Masse des Rezeptors und der phylogenetischen Entwicklungsstufe der einzelnen Spezies deutlich (Haussler et al., 1988).

Das 1,25(OH)₂D₃-endokrine System beinhaltet neben den klassischen Zielorganen Darm, Knochen und Niere weitere Stellen, an denen VDR nachgewiesen werden konnten. So kommen VDR in den β -Zellen des Pankreas, in der Hypophyse, in der Plazenta, im Ovar, in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Hodens, im Gesäuge, in der Haut, sowie in aktivierten B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten und vielen Tumorzellen vor (Bouillon et al., 1995).

4.4.2 Struktur und Funktion

Der VDR weist den typischen Aufbau der Steroidhormonrezeptoren auf, zu denen auch die Rezeptoren für das Thyroxin und die Retinsäure gehören. Er besteht aus einer Polypeptidkette mit zwei funktionellen Domänen: am N-terminalen Ende ist die stark konservierte DNA-Bindungsdomäne mit ihrer charakteristischen Aminosäuresequenz lokalisiert. In diesem Abschnitt befinden sich die beiden „Zinkfinger“, die durch eine Anhäufung der Aminosäure Cystein gekennzeichnet sind, wobei jeweils vier Cysteinmoleküle durch ein Zinkatom fixiert sind und so den Grundstock für die fingerähnliche Aminosäureschleife bilden (siehe Abbildung 5) (Meinecke, 2000). Die Zinkfinger werden durch ein Protein verdeckt. Die Hormonbindungsdomäne befindet sich am C-terminalen Ende des Rezeptors (Haussler, 1986). Die beiden Bindungsstellen können zeit- und temperaturabhängig zerfallen, da der Rezeptor nicht sehr stabil ist (Horst et al., 2003).

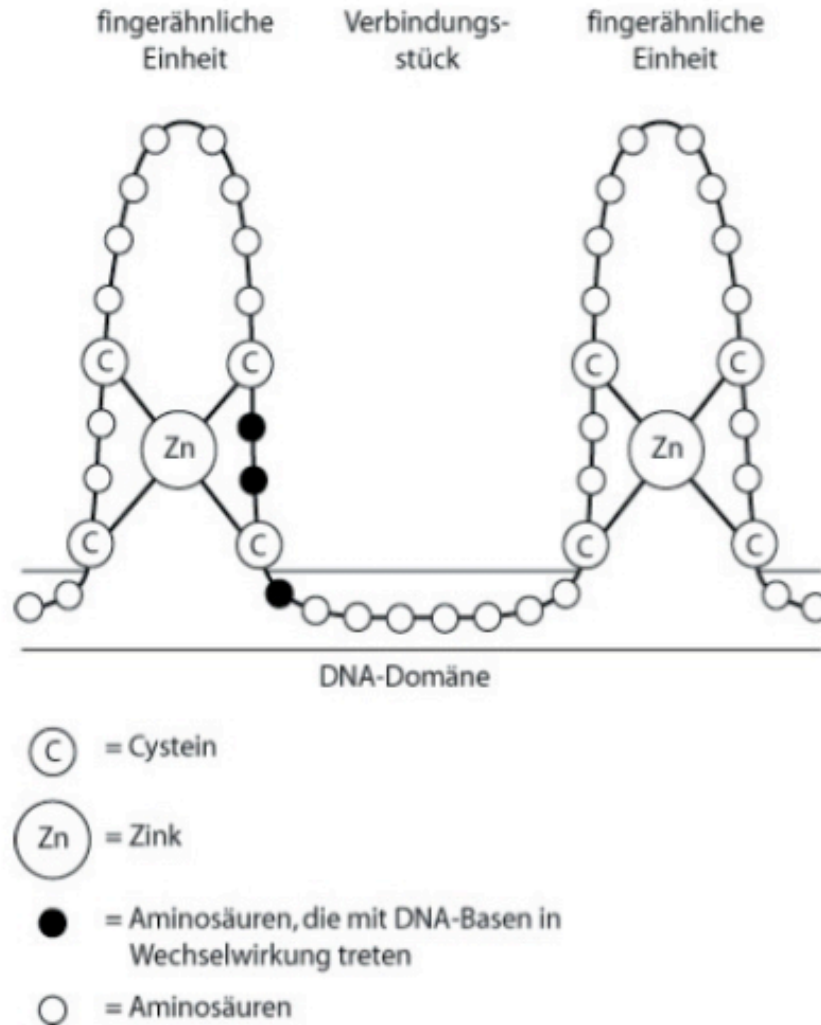


Abbildung 5: Schema der DNA-Bindungsdomäne eines Steroidhormonrezeptors (Meinecke, 2000): Die fingerähnliche Aminosäureschleife, auch „Zinkfinger“ genannt, kommt durch die Anhäufung von vier Cysteinmolekülen zustande, welche durch ein Zinkatom fixiert sind.

1,25(OH)₂D₃ tritt durch einfache Diffusion in die Zelle ein (Nelson und Cox, 2001) und verbindet sich dort mit dem VDR. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex wird anschliessend phosphoryliert und das Protein, welches die Zinkfinger verdeckt, wird abgespalten. Dadurch kann sich der Hormon-Rezeptor-Komplex mit einem nukleären Hilfsfaktor verbinden, welcher auch Retinoid-X-Rezeptor (RXR) genannt wird. Zusammen bilden sie das VDR/RXR-Heterodimer. Dieses Heterodimer besitzt eine hohe Affinität zu einer spezifischen regulatorischen Sequenz der DNA, dem Vitamin-D-Response-Element (VDRE), welches allen Vitamin D-regulierten Genen vorgelagert ist (Jurutka et al., 2001; Dusso et al., 2005). Durch das Andocken des VDR/RXR-Heterodimers an das VDRE kommt es zur Bindung der RNA-Polymerase an diesen Komplex und in der Folge zur Transkription der Vitamin D-

abhängigen Gene (Nelson und Cox, 2001). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bewirkt auf diesem Weg eine erhöhte Syntheserate von folgenden Proteinen: 24-Hydroxylase, alkalische Phosphatase, Calb9k, Calb28k, Osteocalcin, Ca-ATPase und VDR (Haussler et al., 1995). Diese Proteine dienen hauptsächlich der Erhaltung der Ca-Homöostase in den bereits erwähnten klassischen Zielorganen (Darm, Knochen, Niere) (Haussler, 1986).

Weitere Funktionen, die über den VDR vermittelt werden, sind eine erhöhte Zelldifferenzierung sowie eine Hemmung der Zellproliferation und der Kollagensynthese (Haussler et al., 1995). Vit D potenziert auch die Tumornekrose-induzierte Zytotoxizität auf humane Malignomzellen und induziert in verschiedenen Tumorzellen Apoptose. Des weiteren stimuliert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Makrophagendifferenzierung, verändert die T-Lymphozytenaktivität und beeinflusst die Sekretion einiger Peptidhormone, wie z.B. Prolaktin und Insulin (Horst et al., 2003; von Essen et al., 2010).

4.5 Calbindin

4.5.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

Wasserman und Taylor (1966) beobachteten, dass nach der Verabreichung von Vit D₃ an rachitische Hühner die Bildung eines Ca-bindenden-Proteins (CaBP) induziert wurde. Das Protein wurde danach auch im Darm von Ratten gefunden und als Calbindin (Calb) bezeichnet (Kallfelz et al., 1967). Calb wurde in der Folge auch in anderen Spezies und in den anderen klassischen Geweben des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -endokrinen Systems, also Niere und Knochen, nachgewiesen. Daneben kommt Calb aber auch in vielen Geweben vor, die nicht direkt die Ca-Homöostase beeinflussen, wie z.B. Pankreas, Plazenta, Uterus, Gehirn, Lunge, Innenohr und Retina. Neben Calb gehören auch Calmodulin, Parvalbumin, Troponin C und S100-Protein zu den CaBP, die eine hohe Affinität für Ca aufweisen ($K_d = 10^{-8}$ - 10^{-6}) (van Eldik et al., 1982). Die CaBP können funktionell in zwei Gruppen eingeteilt werden, nämlich Puffer und Sensoren. Puffer, wie z.B. Parvalbumin, wirken als passive „Stossdämpfer“, die grössere Schwankungen der intrazellulären Konzentration an freiem Ca verhindern und somit dem Zellschutz dienen. Bei den Sensoren wie Calmodulin hingegen handelt es sich um aktive Regler, die eine wichtige Rolle in second-messenger-Systemen spielen indem sie direkte Ca-abhängige Signalkaskaden modulieren und in vielfältiger Weise in die Zellfunktion eingreifen. Biochemisch betrachtet werden das Calbindin D9k (Calb9k) und Calbindin D28k (Calb28k) unterschieden. Calb9k besitzt ein Molekulargewicht von 9 kDa, gehört somit zu den kleinsten CaBP und kommt vorwiegend im Darm von Säugern vor. Calb28k, mit einem

Molekulargewicht von 28 kDa, ist in hohen Konzentrationen im Vogeldarm, aber auch in Darm, Niere, Gehirn, Uterus und Pankreas von Säugern und Vögeln nachweisbar (Fullmer und Wasserman, 1981).

4.5.2 Struktur und Funktion

Das gemeinsame Merkmal der CaBP ist eine oktaedrische Ca-bindende Struktur, die als EF-Hand bezeichnet wird und durch eine Helix-Loop-Helix-Anordnung der Polypeptidkette zustande kommt. Es handelt sich um zwei α -Helices, E und F, die durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Diese Schleife stellt die Ca-bindende Struktur dar. Die molekulare Struktur der Ca-Bindungsdomäne lässt sich bildlich durch die Finger der rechten Hand darstellen (siehe Abbildung 6), wobei die N-terminal gelegene E-Helix als Zeigefinger und die C-terminale F-Helix als Daumen angesehen werden können (Christakos et al., 1989). Calb9k besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 78 Aminosäuren und besitzt vier Haupthelices. Zwischen den Helices I und II sowie III und IV befindet sich je eine EF-Hand als Ca-bindende Domäne. Das grössere Calbindin D28k besteht aus 261 Aminosäuren und besitzt sechs EF-Hände, von denen jedoch zwei ihre hohe Ca-Bindungsaffinität im Laufe der Evolution verloren haben. Es handelt sich dabei um die EF-Hand II und IV, denen zwei der fünf sauerstoffhaltigen Aminosäuren, die für die Bindung von Ca wichtig sind, fehlen (Hunziker und Schrickel, 1988). Calb9k und Calb28k sind, ausser im Gehirn, Vit D-abhängig, zeigen Hitzestabilität und ihr isoelektrischer Punkt befindet sich im sauren Bereich ($\text{pH} \approx 4,7$) (Christakos et al., 1989).

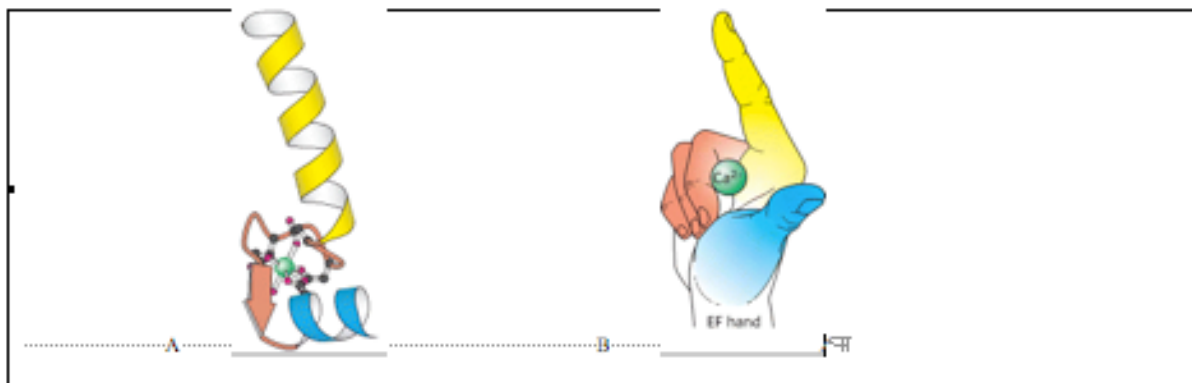


Abbildung 6: A: Strukturanalyse der einzelnen Polypeptidkette aus Aminosäuren; B: Bildliche Darstellung der EF-Hand (Berg et al., 2001): gelb: N-terminale E-Helix (= Zeigefinger); blau: C-terminale F-Helix (=Daumen); rot: Verbindung durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren (=restliche Finger)

Die genaue physiologische Funktion von Calb ist trotz zahlreicher Studien noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Aufgabe von Calb im Darm (Calb9k bei Säugetieren und Calb28k bei Vögeln) und in der Niere (Calb28k) ist der Transport von Ca zur basolateralen Membran der Epithelzellen, von wo aus das Ca aktiv durch die PMCA und den NCX1 aus der Zelle ausgeschleust wird (Christakos et al., 2003). In Studien mit Inselzellen des Pankreas konnte gezeigt werden, dass Calb28k durch die Regulation des intrazellulären Ca eine Rolle bei der Freigabe von Insulin spielt (Sooy et al., 1999). Eine weitere wichtige Funktion des Calb28k ist der Schutz gegen Apoptose in verschiedenen Zelltypen. Möglicherweise verhindert Calb28k eine Ca-induzierte Schädigung der Mitochondrien und die nachfolgende Abgabe von Cytochrom c, das als Trigger für die Apoptose funktionieren soll (Christakos et al., 2003). Calb28k lässt sich im distalen Nierenkonvolut von Amphibien und höheren Wirbeltieren nachweisen, wie auch im Duodenum von Vögeln und Reptilien, nicht aber im Duodenum von Säugetieren und Amphibien. Bei Fischen kommt Calb28k weder in der Niere noch im Duodenum vor. Im Zentralen Nervensystem lässt sich das Protein bei allen Spezies in Perikaryen und Fasern identifizieren. Es wird deshalb vermutet, dass es sich beim Calb28k um ein phylogenetisch altes, ursprünglich neuronales Protein handelt, dessen Präsenz in anderen Geweben eine Erscheinung in der Entwicklung höherer Spezies ist (Parmentier et al., 1987).

Da sich die vorliegende Arbeit auf die Ca-Aufnahme im Gastrointestinaltrakt beschränkt, soll sich die weitere Besprechung auf Calb9k beschränken.

4.5.3 Calbindin D9k im Darm von Säugetieren

Im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren herrscht Calb9k vor (Khanal und Nemere, 2008). Die Anwesenheit und Verteilung von Calb9k im Darm des Pferdes wurde bisher noch nicht untersucht. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spielt für die intestinale Ca-Absorption eine zentrale Rolle, indem es unter anderem die Calb9k-Synthese stimuliert. Wie bereits erwähnt, bindet Calb9k Ca-Ionen reversibel nach deren Aufnahme ins Zytoplasma der Enterozyten und transportiert sie zur basolateralen Seite, wodurch es neben dem transzellulären Transport die Funktion eines zytosolischen Puffers bekommt. Die Zellapoptose, welche durch den Anstieg der freien, intrazellulären Ca-Ionen ausgelöst werden würde, wird so verhindert (Christakos et al., 2003). Dupret et al. (1987) konnten bei Ratten aus einer Vit D-freien Haltung nach einer einmaligen Injektion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Verdoppelung der Calb9k-mRNA im Duodenum nachweisen. Eine weitere Untersuchung über die Regulation der Calb-Genexpression wurde von Christakos et al. (1992) an Ratten durchgeführt. Bei Vit D-frei und Ca-arm gefütterten

Ratten konnte nach Verabreichung von Vit D ein Anstieg der Calb9k-mRNA im Darm und der Calb28k-mRNA in der Niere beobachtet werden, aber kein vergleichbarer Anstieg der VDR-mRNA. Wurden die Ratten dagegen mit einer Vit D-angereicherten Diät gefüttert, führte die Verabreichung von Vit D zu einer Induktion sowohl der Calb-Genexpression als auch der VDR-mRNA in Darm und Niere. Diese Ergebnisse lassen die Präsenz eines Inhibitors der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelten Rezeptor-Aufregulierung bei den Vit D- und Ca-Mangel-Ratten vermuten.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Probengewinnung

5.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Darmproben von zehn adulten Pferden (acht Stuten, zwei Wallache) entnommen. Die Pferde wurden von einem Händler zur Schlachtung angeliefert. Es sind keine Informationen über Alter und Fütterungsvorgeschichte bekannt.

5.1.2 Aufbereitung des Probenmaterials

Die Tiere wurden mit einem Bolzenschussapparat betäubt und durch Ausbluten getötet. Die Proben für die Ussing-Kammer Versuche wurden ungefähr 10 min nach der Betäubung entnommen. Direkt anschliessend wurden die restlichen Proben innerhalb von ungefähr 20 min entnommen.

Die genauen Lokalisationen der Probenentnahme sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Entnahmestellen der Proben

Bezeichnung	Abkürzung	Beschreibung
Duodenum	DD	ca. 10 cm aboral der Pankreaseinmündung
Jejunum	JE	ca. in der Mitte des Darmabschnittes
Ileum	IL	ca. in der Mitte der Plica ileocaecalis
Caecumkörper	CC	ca. auf Höhe der Einmündung des Ileums
Colon ascendens ventrale Lage	CAV	ca. 30 cm aboral vom Ostium caecocolicum, vom Grund
Colon ascendens dorsale Lage	CAD	in der Mitte der magenähnlichen Erweiterung, vom Grund
Colon descendens	CD	ca. 100 cm oral des Anus

Die Proben für die *Ussing-Kammer Versuche* wurden in eisgekühlte und mit Oxycarbon begaste Parson-Puffer-Lösung (vgl. 9 Anhang) gelegt und sofort ins Labor gebracht. Von fünf Pferden wurden Proben von Duodenum und Caecumkörper entnommen, von den anderen fünf Pferden Proben von Colon ascendens dorsale Lage und Colon descendens.

Für die *Immunhistologie* wurden ca. 3x4 cm grosse Proben entnommen, in 0,9% NaCl-Lösung kurz gewaschen und anschliessend in 4%igem, neutral gepuffertem Formalin während 24 h fixiert. Um eine optimale Fixierung der Schleimhaut zu erreichen, wurden die

Darmstücke mit der Schleimhaut nach oben an Korkplatten angeheftet. Danach wurden die Proben in Bio-optica Kassetten® (P.H. Stehelin&CIE AG, Basel, CH) während 24 h gewässert und in 70% Alkohol verbracht. Für die nachfolgende Paraffineinbettung wurden kleine, ca. 0,5x0,5 cm grosse Stücke zurechtgeschnitten. Die Infiltration der Gewebeproben wurde maschinell mit einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP1020®, Leica, Nussloch, D) durchgeführt. Mit der Paraffinausgiessstation (EG1160®, Leica, Nussloch, D) wurden die sieben Darmstücke in einen Block eingebettet. Der Tabelle 2 ist das Protokoll zur Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin zu entnehmen.

Tabelle 2: Protokoll zur Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin

Dauer	Medium
4h	70% Alkohol
4h	70% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	Methylbenzoat
4h	Methylbenzoat
4h	Xylol
4h	Xylol
4h	Paraffin
4h	Paraffin

Mit dem Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica, Nussloch, D) wurden 5µm dicke Paraffinschnitte hergestellt, auf Adhäsions-Objektträger (SuperFrost Plus®, Menzelgläser, Braunschweig, D) aufgezogen und im Wärmeschrank (BE 400/3 TWW, Memmet GmbH, Schwabach, D) bei 37°C während 12 Stunden getrocknet.

Für den *Westerblot* und die *PCR* wurden die Proben direkt nach der Entnahme in mit Trasyol® (Bayer, Zürich, CH) gefüllte Probenröhrchen (Reagenz- und Zentrifugenröhre, 50ml, Sarstedt, Nümbrecht, D) und diese anschliessend in flüssigen Stickstoff verbracht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

5.2 Ussing-Kammer Versuche

Für die Experimente wurde eine modifizierte Ussing-Kammer (Ussing und Zerahn, 1951) verwendet. Die Gewebeproben (Duodenum, Caecumkörper, Colon ascendens dorsale Lage und Colon descendens) wurden zwischen zwei miteinander verschraubbaren Plexiglashälften

aufgespannt und von beiden Seiten her mit Parson-Puffer umspült. Um den pH-Wert des Parson-Puffers auf 7,4 zu halten, wurde er kontinuierlich mit 5% CO₂ und 95% O₂ begast und mit einer zirkulierenden Wasserummantelung auf 37°C temperiert. Durch eine Computer-kontrollierte automatische voltage-clamp-Anlage (AC Microlamp, Ingenieurbüro Mussler, Aachen, D) wurde ein Kurzschlussstrom (short-circuit current = I_{sc}) in das System eingespeist, so dass die PD zwischen der mukosalen und der serosalen Seite auf Null eingestellt wurde. Zur Bestimmung der Gewebeleitfähigkeit G_t wurde in Intervallen von 1 min ein Stromimpuls (I_{Klemm}) von abwechselnd $I_{sc} + 100\mu A$ und $I_{sc} - 100\mu A$ für 1 s angelegt. Aus der daraus resultierenden Spannung (U_{Klemm}) wurde nach dem Ohmschen Gesetz die Leitfähigkeit des Gewebes berechnet:

$$G_t = I_{Klemm} / U_{Klemm}$$

Die Werte für den Kurzschlussstrom I_{sc} und die Gewebeleitfähigkeit G_t wurden jede Minute aufgezeichnet.

Zusätzlich wurde 10 min nach dem Aufspannen der Gewebeproben in die Ussing-Kammer 10 μl $^{45}Ca^{2+}$ in eine Kammerhälfte (markierte Seite) hinzugefügt. Nach weiteren 60 min wurde mit der Messung der unidirektionalen Ionenflüsse begonnen, wobei die Messungen in Intervallen von 20 min weitergeführt wurden. Zur Bestimmung der Mukosa-nach-Serosa-Fluxe (J_{ms}) wurde der Marker auf der mukosalen Seite, für die Serosa-nach-Mukosa-Fluxe (J_{sm}) auf der serosalen Seite zugegeben. Der Nettoflux wurde aus der Differenz der beiden unidirektionalen Ionenflüsse berechnet:

$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

Ein positiver J_{net} weist auf eine Netto-Absorption von mukosal nach serosal hin, ein negativer J_{net} auf eine Netto-Sekretion von serosal nach mukosal.

5.3 Immunhistochemie

5.3.1 VDR

Um den Vitamin D-Rezeptor zu markieren, wurde ein monoklonaler Antikörper (Rat monoclonal [9A7] to Vitamin D Receptor (ab8756), Abcam, Cambridge, UK) verwendet, der keine Kreuzreaktionen mit Östrogen- oder Glukokortikoid-Rezeptoren aufweist. Der Primärantikörper reagiert mit der C-terminalen DNA-Bindungs-Domäne des VDR, sowohl mit der besetzten als auch mit der unbesetzten Form. Beim Sekundärantikörper handelt es sich um einen polyklonalen, biotinylierten Antikörper, der gegen IgG der Ratte gerichtet ist und aus dem Kaninchen gewonnen wurde (Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunglobulins/

Biotinylated E0468, Dako, Glostrup, DK). Als Visualisierungssystem wurde das StreptABComplex/HRP Duett (Dako, Glostrup, DK) verwendet und mit dem Chromogen DAB (Liquid DAB+ Substrate, Dako, Baar, CH) sichtbar gemacht.

Das Protokoll für die Entparaffinierung, Rehydrierung und die immunhistologische Färbung ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Es wurde eine zuvor überprüfte Positivkontrolle vom Duodenum der Ziege und zur Überprüfung des Sekundärantikörpers eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstatt mit dem Primärantikörper mit TBS inkubiert wurde. Um den Primärantikörper zu überprüfen wurde zusätzlich eine Isotypenkontrolle mit Ratten-Non-Immunserum mitgeführt.

Tabelle 3: Immunhistochemie-Protokoll: VDR-AK (ab 8756)

Arbeitsgang	Medium	Dauer
1. Waschen in	Xylol	2 x 5 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Aqua dest.	2 min
2. Spülen mit	TBS	5 min
3. Kochen in	Citratpuffer (vgl. 9 Anhang)	3 x 5 min
4. Abkühlen in	Citratpuffer in Kaltwasserbecken	20 min
5. Spülen mit	TBS	2 x 5 min
6. Waschen in	3% H ₂ O ₂	10 min
7. Spülen mit	TBS	3 min
	auf Coverplates bringen	
8. Inkubieren mit	150 µl Protein-Block-Serum-free	10 min
9. Spülen mit	TBS	5 min
10. Inkubieren mit	150 µl VDR-AK (ab8756); Verdünnung 1:100	60 min
11. Spülen mit	TBS	3 x 3 min
12. Inkubieren mit	150 µl biotinyliertem Anti-Rat-IgG (E0468); Verdünnung 1:200	30 min
13. Spülen mit	TBS	3 x 3 min
14. Inkubieren mit	StreptABComplex/HRP	30 min

15. Spülen mit	TBS	3 x 3 min
16. Entwickeln mit	DAB	4 min
17. Spülen mit	TBS	5 min
18. Kernfärbung mit	Hämalaun	10 s
19. Waschen unter	fließendem Wasser	10 min
20. Waschen in	Ethanol 70%	1 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Xylol	2 x 5 min
21. Eindecken mit	Pertex [®]	

TBS = Tris gepufferte NaCl-Lösung, pH = 7,6 (vgl. 9 Anhang); H₂O₂ = Wasserstoffperoxid;
DAB = Chromogen 3,3' Diaminodenzidin

5.3.2 Calbindin D9k

Beim Primärantikörper für Calbindin D9k handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen (Rabbit antibody to Calbindin D-9k, Swant, Bellinzona, CH). Für die Markierung des Primärantikörpers wurde das PowerVision-System (PowerVision Poly-HRP IHC Detection System, anti Rabbit IgG, Leica Biosystems, Newcastle, UK) verwendet und mit dem Chromogen DAB (Liquid DAB+ Substrate, Dako, Baar, CH) eine braune Farbreaktion hervorgerufen.

Die immunhistologische Färbung wurde gemäss dem Protokoll in Tabelle 4 durchgeführt.

Positiv- und Negativkontrollen wurden wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. Für die Isotypenkontrolle wurde Kaninchen-Non-Immunserum verwendet.

Tabelle 4: Immunhistochemie-Protokoll: Calbindin D9k

Arbeitsgang	Medium	Dauer
1. Waschen in	Xylol	2 x 5 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Aqua dest.	5 min
2. Spülen mit	TBS	5 min
3. Waschen in	3% H ₂ O ₂	15 min

4. Spülen mit	TBS auf Coverplates bringen	5 min
5. Inkubieren mit	150 µl Normalgoat-Serum	20 min
6. Spülen mit	TBS	5 min
7. Inkubieren mit	150 µl Protein-Block-Serum-free	10 min
8. Spülen mit	TBS	5 min
9. Inkubieren mit	150 µl Calbindin D-9k-AK Verdünnung 1:5000	60 min
10. Spülen mit	TBS	3 x 5 min
11. Inkubieren mit	PowerVision (Poly-HRP anti-rabbit IgG)	30 min
12. Spülen mit	TBS	5 min
13. Entwickeln mit	DAB	3 min
14. Spülen mit	TBS	5 min
15. Waschen in	Ethanol 70%	2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Xylol	2 x 5 min
16. Eindecken mit	Pertex®	

TBS = Tris-gepufferte NaCl-Lösung, pH = 7,6 (vgl. 9 Anhang); H₂O₂ = Wasserstoffperoxid;
DAB = Chromogen 3,3' Diaminodenzidin

5.4 Westernblot

5.4.1 Aufarbeitung des Gewebes und Durchführung des Nachweises

Für die Proteinextraktion wurde eine ca. 1x1cm grosse Probe in einem Handhomogenisator in einer working-solution aus Net-2-buffer (vgl. 9 Anhang) und Proteinaseinhibitor zerkleinert. Das Homogenisat wurde 10 min bei 9500G bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Durch die Bradford Methode wurde die Proteinkonzentration mittels eines UV-Spektrophotometers (SmartSpec™ Plus, BioRad, Reinach, CH) und Kunststoff-Einmalküvetten (Semimicrovolume cuvette, quartz, BioRad, Reinach, CH) bei 595nm gemessen und mit Net-2-buffer und Sample buffer (vgl. 9 Anhang) auf eine Konzentration von 3.0 µg/µl verdünnt. Anschliessend wurden die Probenpräparationen bei 95°C für 5 min erhitzt und 20-30µg davon mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit einem Tank-Blot-System (Criterion Blotter, Bio Rad, Basel, CH) wurden die Proteine nun aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immuno-Blot™ PVDF Membran, Bio Rad, Basel, CH) übertragen. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer Blocking Solution (PBS/0.25%Tween 20 + 5% Milchkpulver, für PBS vgl. 9 Anhang) während einer Stunde blockiert, anschliessend wurde die verdünnte Primärantikörper-Lösung aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert (Antikörperverdünnungen wurden stets in PBS/0.25%Tween 20 + 2,5% Milchkpulver gemacht). Um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese während 5 x 10 min mit PBS/0.25%Tween 20 gewaschen. Der mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper ist gegen die IgG des Primärantikörpers gerichtet und wurde während einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschritten von je 10 min mit PBS/0.25%Tween 20 folgte die Detektion mit einem Immun-Star Chemiluminescent Kit, der für 5 min auf die Membran aufgetragen wurde. Die Entwicklung erfolgte mit einem LAS-3000 (Fujifilm).

5.4.2 Vitamin D-Rezeptor

Für die Auftrennung des Proteingemischs wurde ein SDS-Page-Gel mit einem Polyacrylamidanteil von 8% verwendet. Beim Primärantikörper handelt es sich um den bei der Immunhistologie verwendeten monoklonalen Antikörper (Rat monoclonal [9A7] to Vitamin D Receptor (ab8756), Abcam, Cambridge, UK), der 1:1000 verdünnt wurde. Der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:30'000 stammt aus dem Kaninchen und ist gegen Ratten-IgG gerichtet (Rabbit polyclonal to Rat IgG – H&L (HRP), (ab6734), Abcam,

Cambridge, UK). Für die Detektion wurde das Immun-Star WesternC Chemiluminescent Kit (Bio Rad, Basel, CH) verwendet.

5.4.3 Calbindin D9k

Das SDS-Page-Gel für den Nachweis von Calbindin D9k besitzt einen Polyacrylamidanteil von 17%. Der Primärantikörper wurde 1:5000 verdünnt und entspricht ebenfalls dem der Immunhistologie (Rabbit antibody to Calbindin D-9k, Swant, Bellinzona, CH). Als Sekundärantikörper wurde ein gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper verwendet, der aus der Ziege gewonnen wurde (Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate, Promega, Dübendorf, CH). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers entspricht 1:20'000. Die Detektion erfolgte mit einem Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (Bio Rad, Basel, CH).

5.5 Qualitative RT-PCR

5.5.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde die Trizol[®]-Methode verwendet. Das Probenmaterial wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und durch Schläge mit einem sauberen Hammer vorzerkleinert. Die entstandenen Gewebesplitter wurden aus der Aluminumfolie herausgenommen und in einem vorgekühlten, sterilen Mörser mit Pistill in flüssigem Stickstoff weiter zerkleinert. Das resultierende Gewebepulver wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäss verbracht, in dem 1 ml Trizol[®] (GibcoBRL, Life Technologies) vorgelegt wurde. Eine weitere Zerkleinerung erfolgte mit einem Ultraturrax (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, CH), bis keine grösseren Partikel mehr zu sehen waren. Nach 10 min auf Eis wurde 200 µl Chloroform (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH) hinzupipettiert, geschüttelt, 5 min stehen gelassen und danach bei 4°C 20 min bei 11200-18700G zentrifugiert. Die obere, wässrige Schicht wurde abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäss überführt und nochmals mit Chloroform bearbeitet. Der obere, wässrige, RNA-haltige Überstand wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäss überführt und zur Fällung der RNA mit Isopropanol zu gleichen Volumenanteilen versetzt, geschüttelt und für 30 min bei -20°C kalt gestellt. Nach nochmaligem Aufschütteln wurde wieder 10 min bei 4°C und 18'700G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 70% Ethanol (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH) zugegeben, die Probe für 10 min auf Eis gestellt und anschliessend 10 min bei 4°C und 18'700G zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und der Überstand verworfen. Es entstand ein Pellet, das bei Raumtemperatur getrocknet wurde, bis es weiss

erschien. Zum Schluss wurde 50 µl DEPC-Wasser (vgl. 9 Anhang) mit 1 µl RNase-Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor, 40U/µl, Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH) dazugeben, um die RNase- spezifische Enzymaktivität zu unterdrücken.

Es erfolgte eine photometrische Dichtebestimmung mit einem UV-Spektrophotometer (SmartSpec™ Plus, BioRad, Reinach, CH) und trUView Cuvettes (BioRad, Reinach, CH) bei 260 nm. Als Leerwert wurde DEPC-Wasser verwendet. Es wurde anhand der gemessenen Konzentration eine RNA-Arbeitsverdünnung von 100ng/ml hergestellt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

5.5.2 DNase-Behandlung

Die gewonnene RNA wurde vor der RT-PCR mit DNase behandelt, um eine Amplifikation von allfällig noch in der Probe vorhandener genomischer DNA zu verhindern.

Der DNase-Mix (vgl. Tabelle 5) wurde unter Kühlung auf Eis in 0,5 ml Plastikreaktionsgefässen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf,D) gemäss Tabelle 5 hergestellt. Der DNase-Puffer und die DNase stammten von Roche Molecular Biochemicals, Basel, CH; der RNase-Inhibitor von MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH.

Tabelle 5: Zusammensetzung des DNase-Mixes

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
DNase Puffer	2	5x
DNase I, RNase-frei	1	10 U/µl
RNase-Inhibitor	0,25	40 U/µl
Gesamtvolumen	3,25	

Zu den 3,25 µl DNase-Mix wurden 6,65 µl der RNA-Arbeitsverdünnung gegeben, womit ein Endvolumen von 9,90 µl erhalten wurde.

In einem Mastercycler gradient (Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH) wurde die DNase-Behandlung unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Phase 1: 10 min bei 37°C

Phase 2: 5 min bei 75°C

Phase 3: abkühlen auf 4°C

Weil die RNA nach der DNase-Behandlung nur für kurze Zeit stabil ist, wurde die Reverse Transkription (RT) direkt anschliessend durchgeführt.

5.5.3 Reverse Transkription (RT)

Um die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben wurde der GeneAmp[®] Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) verwendet.

Der RT-Mastermix wurde gemäss Tabelle 6 auf Eis zusammenpipettiert und pro Ansatz 1,5 µl der DNase behandelten RNA-Lösung zugegeben.

Tabelle 6: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
MgCl ₂	2	25 mM
PCR-Puffer	1	10x
dNTP-Mix	4	10 mM
Random Hexamers	0,5	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5	50 U/µl
Gesamtvolumen	8,5	

Die Behandlung der Proben im Mastercycler gradient (Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH) fand nach folgendem Programm statt:

Phase 1: 8 min bei 21°C

Phase 2: 15 min bei 42°C

Phase 3: 5 min bei 99°C

Phase 4: abkühlen auf 4°C

Die synthetisierte cDNA ist stabil und kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden.

5.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Primer-Mix für die qualitative PCR besteht aus dem PCR-Prämix (s. Tabelle 7), dem genspezifischen Primer-Paar und der thermostabilen DNA-Polymerase (Zusammensetzung des Primer-Mix s. Tabelle 8) .

Die verwendeten Primer-Paare wurden mit Hilfe der Software Oligo Analyser 1.0.2/Oligo Explorer 1.1.0 (Freeware aus dem Internet; Teemu Kuulasma, University of Kuopio,, 70211 Kuopio, Finnland) erstellt und bei Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Prämix

Komponenten	Einfacher Ansatz (μ l)	Stammlösung
MgCl ₂	2	25 mM
PCR-Puffer	4	10x
DEPC-Wasser	32,75	
Gesamtvolumen	38,75	

Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Mix

Komponenten	Einfacher Ansatz (μ l)	Stammlösung
PCR-Prämix	38,75	-
Primer-Vorverd.-Mix ¹⁾	1	10 pmol/ μ l
GOLD AmpliTaq ²⁾	0,25	5 U/ μ l
Gesamtvolumen	40	

- 1) Sense- und Antisense-Primer (jeweils 20 pmol/ μ l in DEPC-Wasser) wurden vorab im Verhältnis 1:1 gemischt. Im Primer-Verdünnungs-Mix liegen die beiden Primer somit in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l vor.
- 2) Die GOLD AmpliTaq[®] DNA-Polymerase wurde verwendet, um eine Hot-Start PCR zu gewährleisten.

Zur Durchführung der qualitativen PCR wurde 10 μ l der cDNA-Lösung und 40 μ l des Primer-Mix vereinigt und unter den folgenden Reaktionsbedingungen behandelt:

- Phase 1: *Initiale Denaturierung/ Aktivierung der GOLD Ampli Taq*
10 min bei 95°C
- Phase 2: *Beginn der Zyklen: 35 Wiederholungen*
 Denaturierung: 1 min bei 94°C
 Annealing = T_A: 2 min bei 60°C (für alle Primer)
 Verlängerung: 1,5 min bei 72°C
- Phase 3: *Ende der Zyklen*
 Finale Verlängerung: 10 min bei 72°C
 Bis zur Entnahme: bei 4°C

Als Positivkontrolle wurde das Housekeeping-Gene GAPDH (1,3-Diphosphoglycerat) oder β -Actin mitgeführt, um die Integrität der mRNA zu überprüfen.

In der Tabelle 9 sind die verwendeten pferdespezifischen Primersequenzen für GAPDH, β -Actin, Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Calbindin D9k (Calb9k) angegeben.

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen

Primer	Batch	Basensequenzen	Länge	Produkt
GAPDH-for GAPDH-rev	1052253 1052254	5'-ATT-CCA-CCC-ATG-GCA-AGT-TC-3' 5'-CGC-TCC-TGG-AAG-ATG-GTG-AT-3'	20bp 20bp	91bp
β -Actin-for β -Actin-rev	3647359 3647360	5'-TCA-TCA-CCA-TCG-GCA-ACG-A-3' 5'-CGT-CAC-ACT-TCA-TGA-TGG-AGT-TGA-3'	19bp 24bp	102bp
VDR-for VDR-rev	3600582 3600583	5'-TGG-TGA-CTT-TGA-CCG-GAA-TGT-3' 5'-CGC-CTG-AAG-AAA-CCT-TTG-CA-3'	21bp 20bp	98bp
Calb9k-for Calb9k-rev	3600580 3600581	5'-TTT-ACT-GAA-AGG-TTC-AAG-CTC-CAT-T-3' 5'-AAC-ACC-TGG-AAT-TCT-TCA-AAA-CTA- ACT-T-3'	25bp 28bp	111bp

for = forward; rev = reverse; bp = basepaar

Die Analyse der PCR-Produkte erfolge mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für die Herstellung des 2%igen Agarosegels wurde im Verhältnis 2g Agarose (GiboBRL, Life Technologies) und 100 ml 1 x TBE Puffer (vgl. 9 Anhang) aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 60 – 80°C wurde 10 μ l Ethidiumbromid (1%, Roth GmbH & Co., Nürnberg, DE) zugegeben, gemischt und das flüssige Gel in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (OWL B2 EasyCast Mini Gel System, Thermo Scientific, Zürich, CH) gegossen und bis zum Erstarren stehen gelassen. Für ein grosses Gel wurde 160 ml Agarosegel verwendet und ein 20-zähniger Kamm zur Bildung der Geltaschen, für ein kleines Gel 60 ml Agarosegel und ein 10-zähniger Kamm. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingelegt, welche mit 1 x TBE Puffer bis ca. 0,5 cm oberhalb des Gels aufgefüllt wurde.

Es wurden 15 μ l des PCR-Produkts mit 1,5 μ l Ladepuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH) gemischt und anschliessend in die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Grössenstandard wurde 1 μ l des Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH) zusammen mit 1,5 μ l Ladepuffer und 7 μ l DEPC-Wasser in eine Geltasche eingebracht. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 300 mA während ca. 40 min mit einem

Powersupply-Gerät (LKB Bromma, Golden, USA). Mittels UV-Licht erfolgte die Detektion der aufgetrennten Proben im Molecular Image Gel Doc XR (BioRad, Reinach, CH) bei 312 nm.

5.6 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Die Real Time PCR stellt eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR dar. Sie wird auch ‚quantitative PCR‘ genannt, weil sie das Expressionsniveau der RNA in einer Probe bestimmt. In dieser Arbeit wurde das TaqMan-Sonden Verfahren angewendet.

Die mRNA muss wie bei der RT-PCR zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte anhand der unter Kapitel 5.5.2 und 5.5.3 beschriebenen Protokolle für die DNase-Behandlung und die Reverse Transkription.

5.6.1 TaqMan PCR Prinzip

Als TaqMan-Sonde bezeichnet man ein kurzes Oligonukleotid, das als Gensonde spezifisch an die PCR-Matrize bindet. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff „6-FAM“ ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde gebunden, während sich am 3'-Ende der Quencher-Farbstoff „TAMRA“ befindet. Durch die räumliche Nähe in der intakten Sonde unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters durch einen Fluorezenz-Energietransfer.

Die Taq-Polymerase verlängert – ausgehend von den spezifisch gebundenen Primern – die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA und stösst dabei auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, die aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird. Es kommt zu einer Unterbrechung der räumlichen Nähe und des Fluoreszenz-Energietransfers zwischen Reporter und Quencher, was zu einem Fluoreszenzsignal führt, welches direkt mit der PCR-Produktzunahme korreliert. Nicht hybridisierte Sonden werden nicht abgebaut und zeigen deshalb auch kein Fluoreszenzsignal.

5.6.2 Durchführung

Als MasterMix für die Real Time PCR wurde der FastStart Universal Probe Master (ROX) von Roche (Basel, CH) verwendet. In der Tabelle 10 ist die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes für die Real Time PCR darstellt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei 20 µl Reaktionsansatz mit 5 µl cDNA-Lösung gemischt wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Real Time RT-PCR-Reaktionsansatzes

Komponenten	Einfacher Ansatz (μ l)	Stammlösung
Master Mix	12,5	2 x
Sense-Primer	1,5	5 μ M
Antisense-Primer	1,5	5 μ M
TaqMan-Sonde	1	5 μ M
DEPC-Wasser	3,5	
Gesamtvolumen	20	

Die verwendeten Primer und TaqMan-Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewählt. Die Basensequenzen sind in der Tabelle 11 dargestellt. Die Primer und die Sonden wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

Tabelle 11: Verwendete Primer und TaqMan-Sonden für die Real Time PCR

Primer	Bath	Basensequenzen	Länge	Produkt
β -Actin-for β -Actin-rev	3647359 3647360	5'-TCA-TCA-CCA-TCG-GCA-ACG-A-3' CGT-CAC-ACT-TCA-TGA-TGG-AGT-TGA-3'	19bp 24bp	102bp
β -Actin-Probe5'	2165583	5'-ATG-GAA-TCC-TGT-GGC-ATC-CAC-GAA-ACT-AC-3'	29bp	
VDR-for VDR-rev	3600582 3600583	5'-TGG-TGA-CTT-TGA-CCG-GAA-TGT-3' 5'-CGC-CTG-AAG-AAA-CCT-TTG-CA-3'	21bp 20bp	111bp
VDR-Probe5'	2165585	5'-AGA-CCG-AGC-CAC-AGG-CTT-TCA-TTT-CA-3'	26bp	
Calb9k-for Calb9k-rev	3600580 3600581	5'-TTT-ACT-GAA-AGG-TTC-AAG-CTC-CAT-T-3' 5'-AAC-ACC-TGG-AAT-TCT-TCA-AAA-CTA-ACT-T-3'	25bp 28bp	98bp
Calb9k-Probe5'	1062431	5'-TCA-AAG-AAC-TGG-ACA-AGA-ACG-GAG-ATG-GA-3'	29bp	

Die Durchführung der Real Time-Reaktionen erfolgte in einem 7500 Fast Real Time PCR System unter Verwendung von 96-well optical plates (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) und folgenden Reaktionsbedingungen:

Phase 1:	<i>Initiale Denaturierung</i>	
	10 min bei 95°C	
Phase 2:	<i>Denaturierung</i>	} 40 Wiederholungen
	15 sek bei 95°C	
Phase 3:	<i>Annealing = TA und Verlängerung</i>	
	1 min bei 60°C	

5.6.3 Auswertung

Die mittels Real Time PCR ermittelte Quantifizierung der Expression eines Gens lässt sich in eine absolute und eine relative Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge, also die Kopienzahl eines Gens, ermittelt. Hierbei wird zur Erstellung einer Regressionsgeraden ein genauer Standard benötigt (z.B. eine definierte Menge von Plasmid-DNA des entsprechenden Gens). Bei der relativen Quantifizierung wird der Anstieg bzw. Abfall des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Das House-keeping Gene, das zur Normierung der Daten verwendet wird, sollte daher nicht reguliert sein, d. h. es sollte ein konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Geweben, Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen besitzen. Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit kam die relative Quantifizierung unter Verwendung des House-keeping Genes β -Actin als Referenzgen zum Einsatz.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Dabei gilt, dass zu Beginn der PCR-Reaktion nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen wird, da die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Der CT-Wert definiert also jenen Zeitpunkt, ab dem die Amplifikation und damit die Bildung von Doppelstrang-cDNA exponentiell ist und in dieser Phase die PCR-Reaktion von keinen limitierenden Faktoren, wie

Primer-, Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität eingeschränkt wird.

Der CT-Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens. Je mehr cDNA-Template initial vorhanden ist, umso geringer ist die erforderliche Anzahl an Zyklen, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen: Mit der Formel (1) berechnet man den Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen. Hierbei wird auf das House-keeping Gene β -Actin normalisiert.

$$\Delta CT = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \beta\text{-Actin}} \quad (1)$$

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss zunächst $\Delta\Delta CT$ bestimmt werden. Hierfür wird ein Kalibrator ausgewählt. Als Kalibrator wird die Probe bezeichnet, bei der die Expression am niedrigsten war (also die Probe mit dem höchsten ΔCT Wert). Der ΔCT -Wert des Kalibrators wird von den ΔCT -Werten aller Proben abgezogen (Formel 2).

$$\Delta\Delta CT = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}} \quad (2)$$

Mit Hilfe des $\Delta\Delta CT$, wie in Formel (3) dargestellt, kann die relative Gen-Expression (RGE) bestimmt werden.

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta CT)} \quad (3)$$

Die RGE gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an.

6 RESULTATE

6.1 Ca-Flux Messungen in verschiedenen Darmabschnitten

Die Ca-Netto-Fluxe wiesen in allen untersuchten Darmabschnitten eine hohe individuelle Variabilität auf. Die Mukosa-zu-Serosa-Fluxe (J_{ms}) überstiegen die gegenrichtige Fluxrate (J_{sm}) nur im Duodenum. Es resultierten Ca-Netto-Fluxe ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) zwischen 2,2-54,3 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. In den restlichen drei Darmabschnitten (Caecum, Colon ascendens dorsale Lage, Colon descendens) überstiegen die J_{sm} die J_{ms} , woraus sich negative Ca-Netto-Fluxe ergaben. Die mittleren Calcium-Netto-Fluxe im Dickdarm bewegten sich zwischen -8,0 im dorsalen Colon ascendens und -23,3 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ im Caecum.

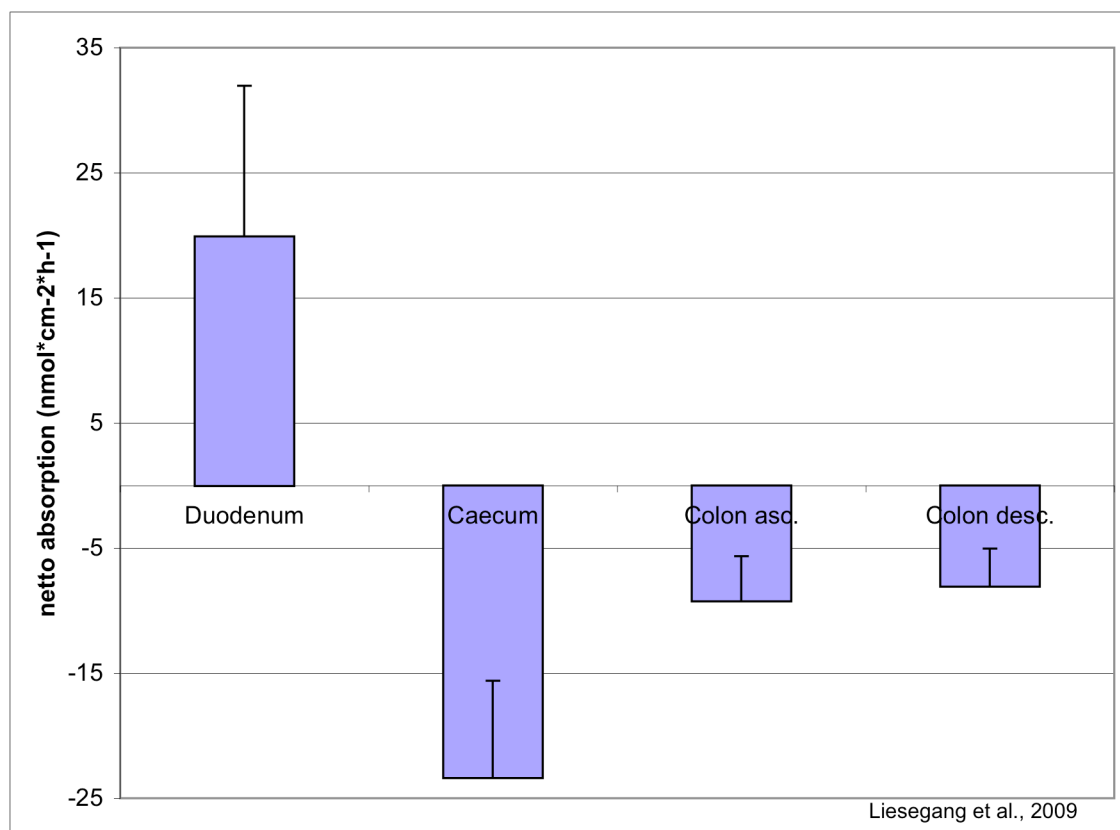


Abbildung 7: Ca-Fluxe in den vier untersuchten Darmabschnitten

6.2 Expression des VDR in den verschiedenen Darmabschnitten

6.2.1 Westernblot

Beim Nachweis des VDR auf Proteinebene mittels Westernblot-Verfahren konnte im Duodenum bei allen Tieren eine stark ausgeprägte Bande auf der Höhe von ~ 50kD gesehen werden (Abbildung 8). Bei drei Pferden ist zusätzlich eine schwache Bande im Jejunum vorhanden. Im Dickdarm sind im ventralen Colon ascendens bei einem Pferd und in der dorsalen Lage des Colon ascendens sowie im Colon descendens bei drei Pferden individuell unterschiedlich starke Banden ausgeprägt (Abbildung 9). Mit dem House-keeping-gene β -Actin wurde die Proteinmenge der einzelnen Proben überprüft (Abbildung 10).



DD JE IL CC CAV CAD CD

Abbildung 8: Westernblot, VDR, Pferd 14: DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon ascendens dorsale Lage, CD=Colon descendens



DD JE IL CC CAV CAD CD

Abbildung 9: Westernblot, VDR, Pferd 18; DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon ascendens dorsale Lage, CD=Colon descendens



DD JE IL CC CAV CAD CD

Abbildung 10: Westernblot, β -Actin, Pferd 18; DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon ascendens dorsale Lage, CD=Colon descendens

6.2.2 Qualitative RT-PCR

Mittels qualitativer RT-PCR konnte die Expression der VDR-mRNA in allen Darmabschnitten nachgewiesen werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung ergaben sich deutliche Banden mit der erwarteten Länge von 111 bp (Abbildung 11). Zur Kontrolle der Intaktheit der mRNA wurde das House-keeping-gene GAPDH verwendet.

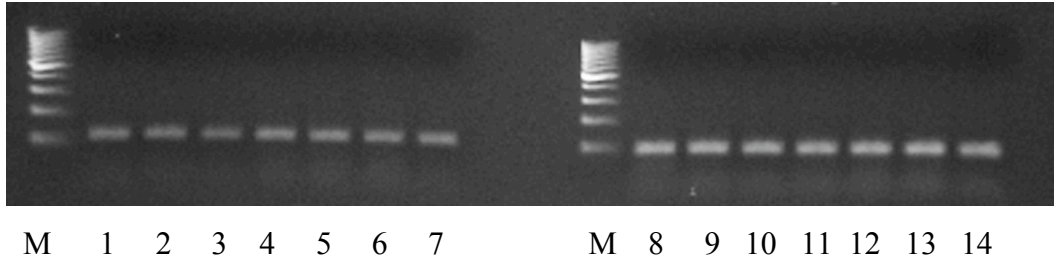


Abbildung 11: Qualitative RT-PCR: Expression der VDR-mRNA in den verschiedenen Darmabschnitten (1-7) und Kontrolle mit GAPDH (8-14); M=Marker, 1/8=Duodenum, 2/9=Jejunum, 3/10=Ileum, 4/11=Caecum, 5/12=Colon ascendens ventrale Lage, 6/13=Colon ascendens dorsale Lage, 7/14=Colon descendens

6.2.3 Quantitative Real-Time-(TaqMan) PCR

Die quantitative Real-Time-(TaqMan) PCR wurde bei vier Tieren durchgeführt. Die mRNA-Expression konnte in allen Darmabschnitten nachgewiesen werden. Die Streuung der mRNA-Expression in den verschiedenen Darmabschnitten war aber sehr gross, so dass sich bei der statistischen Auswertung der Daten keine signifikanten Unterschiede ergaben. Zur Verifizierung der Daten wurde bei zwei weiteren Tieren ebenfalls eine quantitative Real-Time-(TaqMan) PCR durchgeführt, bei denen sich ebenfalls eine grosse individuelle Variation zeigte. Deshalb konnte quantitativ kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den verschiedenen Darmabschnitten gezeigt werden.

6.3 Immunhistochemische Lokalisation des VDR

Beim immunhistochemischen Nachweis des VDR zeigte sich, dass der VDR hauptsächlich im Nukleus der Enterozyten lokalisiert war. Eine schwache Anfärbung war auch im Zytoplasma der Enterozyten vorhanden. Bei visueller Abschätzung der Verteilung innerhalb der verschiedenen Schichten war zu erkennen, dass die stärkste Anfärbung der VDR im Bereich der mittleren und oberflächlichen Drüsenschicht vorkommt und in Richtung der Zottenspitze hin abnimmt (Abbildung 12 und 13). Die Isotypenkontrolle, bei der statt des spezifischen

Antikörpers das Serum einer nicht-immunisierten Ratte verwendet wurde, zeigte keine Anfärbung (Abbildung 14).

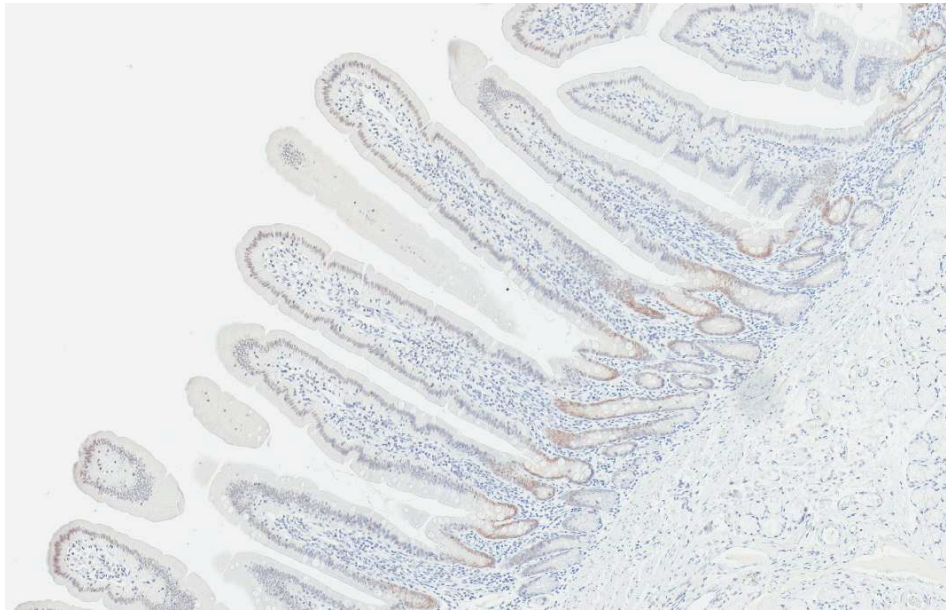


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis des VDR im Duodenum, Übersicht (40-fache Vergrößerung)

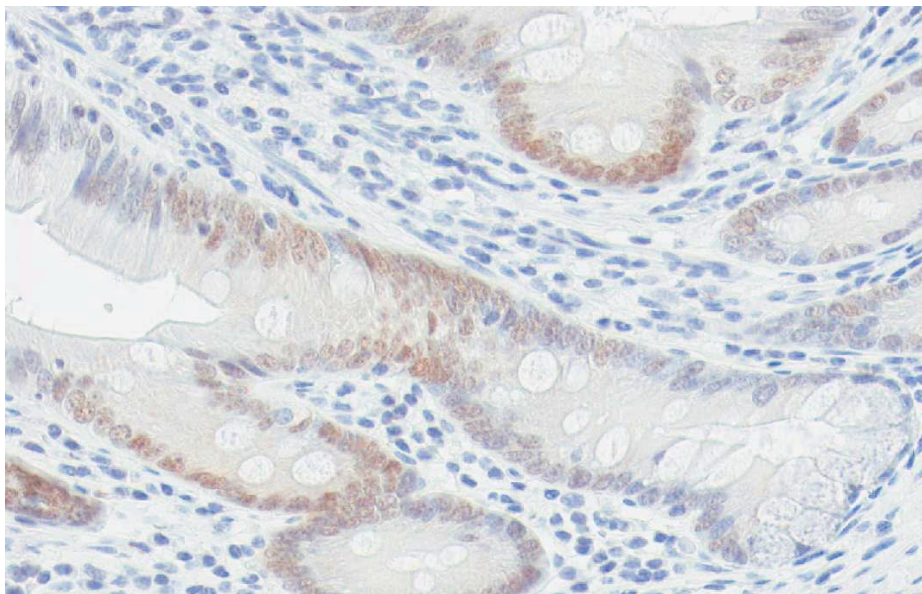


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis des VDR im Duodenum, Kryptenbereich (200-fache Vergrößerung)

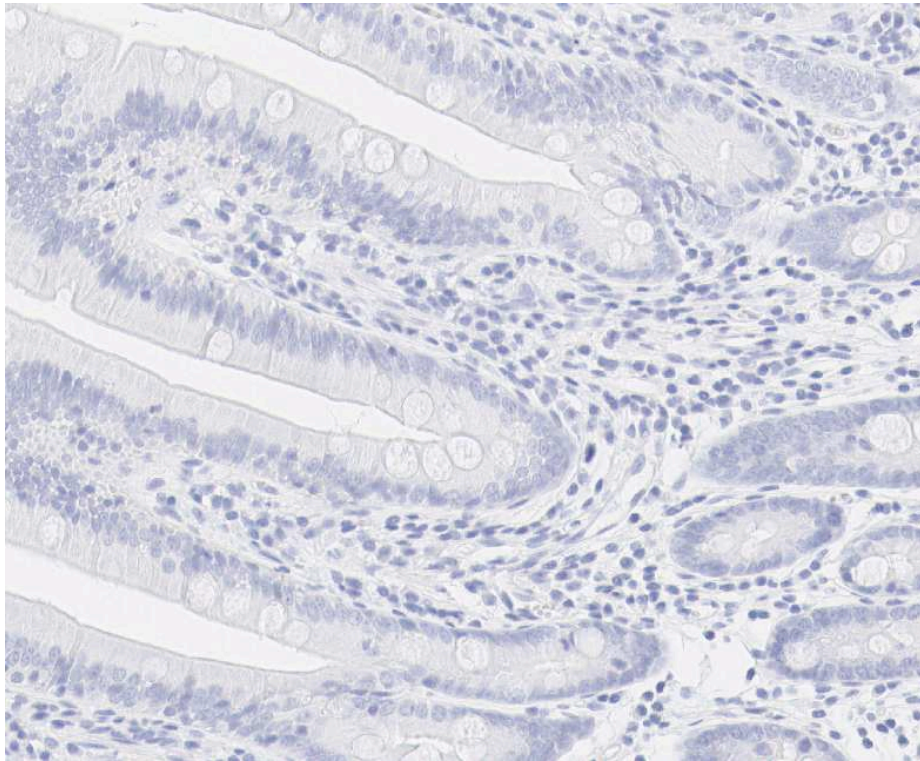


Abbildung 14: Isotypenkontrolle bezüglich VDR im Duodenum (100-fache Vergrößerung)

6.4 Expression von Calbindin D9k in verschiedenen Darmabschnitten

6.4.1 Westernblot

Bei der Westernblot-Analyse von Calb9k in den verschiedenen Darmabschnitten war konstant eine sehr stark ausgeprägte Bande auf der Höhe von $\sim 9\text{kD}$ im Duodenum zu finden (Abbildung 15). Deutlich schwächere Banden waren bei allen zehn Pferden im Jejunum, bei neun Pferden im Caecumkörper und bei sechs Pferden im Ileum sowie in den ventralen Lagen des Colon ascendens zu erkennen. Mit dem House-keeping-gene β -Actin wurde die Proteinmenge der einzelnen Proben überprüft (Abbildung 16).

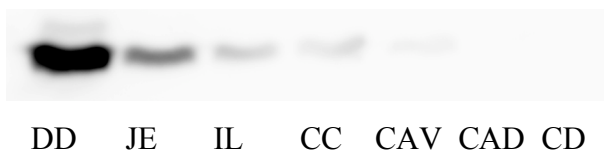
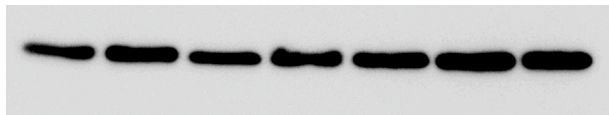


Abbildung 15: Westernblot, Calb9k, Pferd 16; DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon ascendens dorsale Lage, CD=Colon descendens

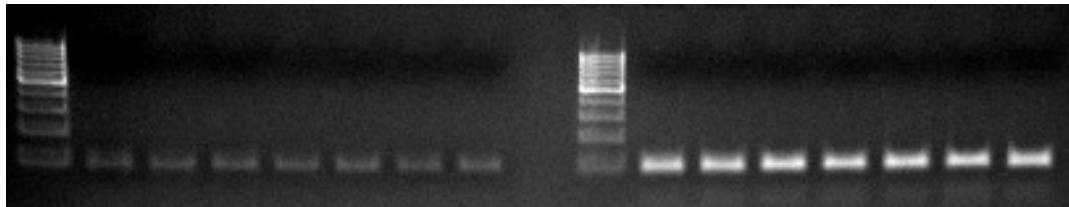


DD JE IL CC CAV CAD CD

Abbildung 16: Westerblot, β -Actin, Pferd 16; DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon aescendens dorsale Lage, CD=Colon descendens

6.4.2 Qualitative RT-PCR

Die qualitative RT-PCR zeigte die Expression von Calb9k-mRNA in allen Darmabschnitten. Die Banden nach elektrophoretischer Auftrennung traten wie erwartet bei 98 bp auf. Die Intaktheit der mRNA wurde ebenfalls mit GAPDH überprüft. (Abbildung 17)



M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14

Abbildung 17: Qualitative RT-PCR: Expression der Calb9k-mRNA in den verschiedenen Darmabschnitten (1-7) und Kontrolle mit GAPDH (8-14); M=Marker, 1/8=Duodenum, 2/9=Jejunum, 3/10=Ileum, 4/11=Caecum, 5/12=Colon ascendens ventrale Lage, 6/13=Colon ascendens dorsale Lage, 7/14=Colon descendens

6.4.3 Quantitative Real-Time-(TaqMan) PCR

Durch die Anwendung der semiquantitativen Real-Time-(TaqMan) PCR bei vier Pferden konnte gezeigt werden, dass die Expression der Calb9k-mRNA im Duodenum am stärksten ausgeprägt ist. Die Expression in den übrigen Darmabschnitten ist deutlich geringer. (Abbildung 18)

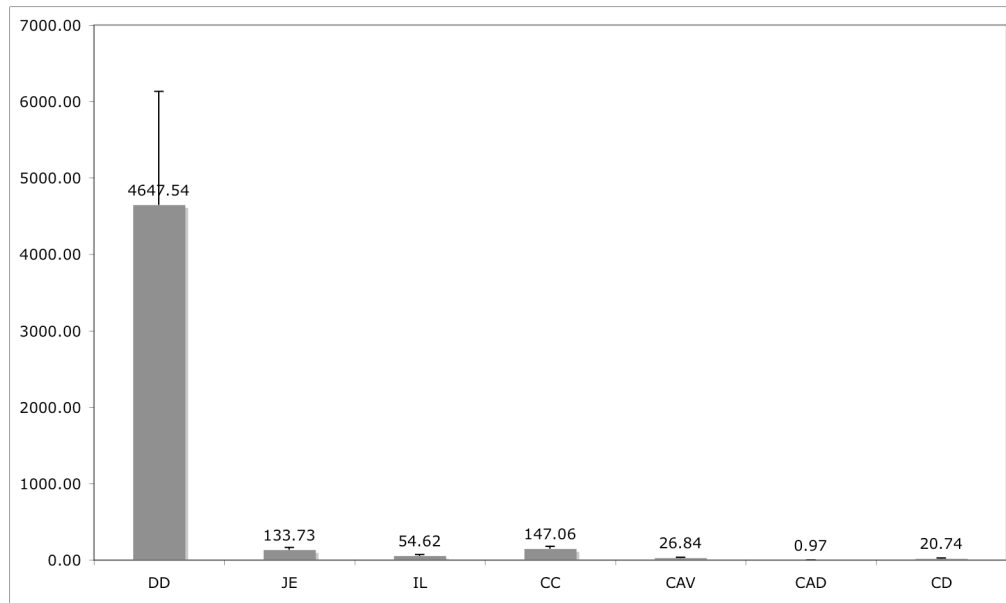


Abbildung 18: Real-Time-(TaqMan) PCR: Expression der Calb9k-mRNA in den verschiedenen Darmabschnitten; RGE=relative gene expression; DD=Duodenum, JE=Jejunum, IL=Ileum, CC=Caecum, CAV=Colon ascendens ventrale Lage, CAD=Colon ascendens dorsale Lage, CD=Colon descendens

6.5 Immunhistochemische Lokalisation von Calbindin D9k

Beim immunhistochemischen Nachweis war Calb9k im Zytoplasma der Enterozyten lokalisiert. Die Becherzellen waren stets negativ. Das Oberflächenepithel der Darmzotten zeigt die stärkste immunhistochemische Anfärbung, welche gegen die Krypten hin abnimmt (Abbildung 19 und 20). In der Isotypenkontrolle mit Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens zeigte sich lediglich eine leichte Hintergrundfärbung (Abbildung 21).

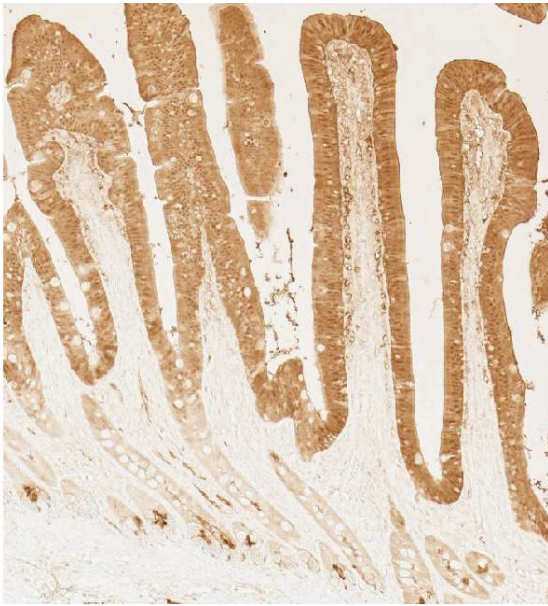


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin D9k im Duodenum, Übersicht (40-fache Vergrößerung)



Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin D9k im Duodenum, Zottenbasis (200-fache Vergrößerung)

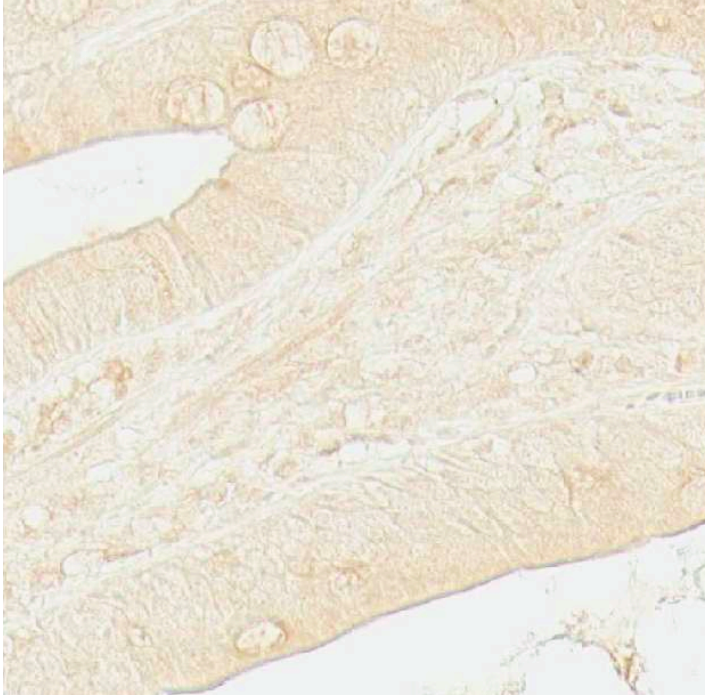


Abbildung 21: Isotypenkontrolle bezüglich Calbindin D9k im Duodenum
(200-fache Vergrößerung)

7 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Ca-Resorption beim Pferd als Beispiel eines Dickdarmverdauers zu untersuchen und einen Vergleich zu anderen Dickdarmverdauern sowie Wiederkäuern zu ziehen. Die Messung der intestinalen Ca-Absorption sowie der Nachweis von VDR und Calb9k, beides Elemente des aktiven Ca-Transports, auf Protein- und mRNA-Ebene in verschiedenen Darmabschnitten waren die evaluierten Parameter. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Kaninchen als Dickdarmverdauer eine grosse Menge an VDR und Calb9k im Caecum aufweist, was eine hohe aktive Ca-Absorption in diesem Darmabschnitt vermuten lässt (de Vries de Heekelingen, 2008). Mit der vorliegenden Untersuchung sollte der Fragestellung nachgegangen werden, in welchem Darmabschnitt die aktive Ca-Absorption beim Pferd, das ebenfalls ein Dickdarmverdauer ist, vorwiegend stattfindet.

Die aufgetretenen individuellen Abweichungen in den Resultaten können möglicherweise durch das stark unterschiedliche Alter und die unbekannte Fütterung der Pferde sowie durch die Inhomogenität der Gruppe erklärt werden.

7.1 Calcium-Fluxe im Gastrointestinaltrakt des Pferdes

Die modifizierte Form der Ussing-Kammer-Methode nach Ussing und Zehran (1951) wurde zur Messung der unidirektionalen Ca-Fluxraten angewandt. Da die Experimente in der Ussing-Kammer in der Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten stattfinden, kann die gemessene Ca-Absorption auf aktive Transportprozesse zurückgeführt werden (Clarke, 2009). In dieser Studie konnte ein hoher positiver Ca-Nettoflux im Duodenum nachgewiesen werden, was auf diesen Darmabschnitt als Hauptort der aktiven Ca-Absorption beim Pferd hindeutet. Im nachfolgenden Verdauungstrakt (Caecum, Colon ascendens dorsale Lage, Colon descendens) können die negativen Ca-Fluxe als Hinweis auf eine Sekretion angesehen werden. Cehak et al. (2009) konnten ebenfalls den grössten Ca-Nettoflux im Duodenum des Pferdes beobachten, gefolgt vom Jejunum, dem dorsalen Colon und dem Caecum. Auch in einer anderen Studie beim Pferd wurde eine signifikante Ca-Absorption im Dünndarm nachgewiesen (Schryver et al., 1970). Die Fütterung und somit die Ca-Konzentration im Darmlumen spielt eine wichtige Rolle für den Weg der Ca-Absorption. Die Bedeutung des parazellulären Transportes nimmt bei den meisten Säugetieren mit steigender Konzentration an freiem Ca im Chymus zu (Wasserman und Fullmer, 1983). Ähnliche Resultate konnten bei

verschiedenen anderen Studien erzielt werden, bei welchen Tiere mit hohen Ca-Gaben mehr als 50% des Ca passiv über den parazellulären Transportweg aufnahmen (Nellans, 1988; Horst et al., 1994). Bei einer niedrigen Ca-Zufuhr über die Nahrung wird Ca v.a. aktiv absorbiert (Bronner, 1987). Die Divergenz der Ergebnisse von Cehak et al. (2009) und den Ergebnissen der vorliegenden Studie in Bezug auf den Dickdarm des Pferdes ist möglicherweise durch eine unterschiedliche Fütterung und deren Einfluss auf den Weg der Ca-Absorption zu erklären.

Durch Untersuchungen an Wiederkäuern konnte gezeigt werden, dass die Ca-Absorption von der speziellen Verdauungsphysiologie einer Tierart beeinflusst werden kann. Bei laktierenden Milchkühen konnten Breves und Schröder (2005) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ricken (2005) eine erhöhte präduodenale Ca-Nettoabsorption mit einer hohen täglichen Ca-Aufnahme messen. Die Unterscheidung zwischen aktiven und passiven Ca-Fluxen war nicht möglich, da die Experimente mit Duodenalkanülen durchgeführt wurden. Mit der Ussing-Kammer-Methode konnte Singer (2006) bei Kühen eine Nettosekretion in Duodenum und Colon messen. Schröder et al. (1997) untersuchten die Ca-Absorption im Gastrointestinal-trakt von kleinen Wiederkäuern. Sie konnten zeigen, dass in allen Darmsegmenten eine Ca-Absorption stattfand, mit Ausnahme des Duodenums bei Schafen, bei welchen analog zu den Kühen, eine Ca-Nettosekretion nachgewiesen wurde. Eine hohe aktive Ca-Aufnahme fand sich im Pansen von Schafen (Holler et al., 1988) und Ziegenlämmern (Sidler-Lauff et al., 2010), was die herausragende Bedeutung dieses Vormagens auch für die Ca-Absorption beim Wiederkäuer unterstreicht. Bei der Ratte als Monogastrier wurde die stärkste Absorption von ionisiertem Ca im Duodenum und im Colon gefunden (Favus und Pak, 2001). In einer anderen Studie an der Ratte wird das Caecum als der Darmabschnitt mit der höchsten Ca-Absorption genannt (Karbach und Feldmeier, 1993).

7.2 Vitamin D-Rezeptor im Gastrointestinaltrakt des Pferdes

Die immunhistochemische Nachweismethode hat gegenüber der biochemischen Technik den Vorteil der eindeutigen topographischen Zuordnung rezeptortragender Zellen im Gewebeverband (Krüdwagen, 1996).

Der VDR im Intestinaltrakt des Pferdes wurde in der vorliegenden Studie nicht nur in den Kernen der Enterozyten, sondern auch in deren Zytoplasma lokalisiert. Untersuchungen am Hühnerdarm bestätigten, dass 0.001% der gesamten Zytosolproteinmenge aus VDR bestehen. Bei dieser als sehr gering angenommenen Menge muss jedoch beachtet werden, dass es sich

als sehr schwierig erwies den Rezeptor in gereinigter Form zu erhalten, was vor allem auf seine extreme Labilität während der Aufreinigung zurückzuführen ist (Pike und Haussler, 1979). Abweichende Ergebnisse wurden an Vit D-mangelernährten Hühnern aufgrund von chromatographischen Untersuchungen festgestellt, bei denen die Rezeptorkonzentration wie folgt verteilt war: Nuklei > Gesamtzellextrakt > Zytosol. Die physiologische Bedeutung des zytosolischen Rezeptors ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist möglich, dass es sich um eine degradierte Form des Rezeptors auf dem Weg zur Elimination oder um einen Artefakt handelt, der durch die Manipulation bei der Präparation des Gewebes entstanden ist (Nakada et al., 1984). Andererseits könnte es sich auch um eine Form des Rezeptors handeln, die dem Transport von Vit D durch das Zytoplasma dient oder die kurz vorher im Zytoplasma synthetisiert wurde (Riner et al., 2008).

Die stärkste Intensität der immunhistochemischen Reaktion am Darmepithel ist, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Clemens et al. (1988) an Hühnerenterozyten, vor allem in den Kernen der Krypten- und weniger deutlich in denen der Zottenepithelzellen zu finden. Daraus wurde geschlossen, dass die Expression des VDR mit der zellulären Differenzierung der Enterozyten korreliert sein könnte. Diese Annahme wurde durch den Nachweis einer unterschiedlichen Menge an VDR in ungleich weit differenzierten Keratinozyten der Epidermis des Menschen in vitro bestätigt. Zellen in einem frühen Wachstumsstadium wiesen hier eine grössere Anzahl VDR auf als Zellen, welche bereits fortgeschritten differenziert waren (Pillai et al., 1988). Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass bereits weiter differenzierte Zellen andere Stoffwechsell Aufgaben übernehmen und deshalb andere Proteine verstärkt exprimiert werden oder dass der Rezeptor in weniger differenzierten Zellen langsamer abgebaut wird (Riner et al., 2008). Eine weitere Erklärung kann aufgrund von Studien über die Differenzierung der Enterozyten gefunden werden. Im Dünndarm differenzieren sich aus den Stammzellen vier verschiedene Zellgruppen: Enterozyten, mukus-sezernierende Becherzellen, Paneth-Zellen und enteroendokrine Zellen (Marshman et al., 2002). Die Panth-Zellen und enteroendokrinen Zellen differenzieren sich im Verlaufe einer abwärts gerichteten Wanderung zur Kryptenbasis aus. Die zukünftigen Enterozyten und Becherzellen wandern in ca. 3-5 Tagen an die Kryptenoberfläche und teilen sich auf diesem Weg mehrmals (Ferraris et al., 1992; Marshman et al., 2002; Pinto und Clevers, 2005). Erst wenn die Enterozyten die intestinale Oberfläche erreichen, wird Ca in die Zellen aufgenommen, wobei die Regulation durch Vit D in diesem Differenzierungsstadium der Zellen nicht mehr ausgeprägt ist. Folglich wird die Vit D-abhängige Calcium-Absorption in den Krypten reguliert (Liesegang et al., 2007), indem dort die Synthese der erforderlichen

Proteine induziert wird. Die diesbezüglichen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werden gestützt durch Studien an Kühen (Liesegang et al., 2008), Ziegen (Boos et al., 2007), und Kaninchen (de Vries de Heekelingen, 2008), bei denen ebenfalls ein stärkerer Nachweis von VDR im Drüsenepithel im Vergleich zum Oberflächenepithel gelang.

Der VDR wurde auf der Proteinebene hauptsächlich im Duodenum nachgewiesen, weniger ausgeprägt auch in den übrigen Darmabschnitten. Die VDR-mRNA konnte mit der RT-PCR qualitativ in allen Darmabschnitten nachgewiesen werden, allerdings waren quantitativ sowohl zwischen den verschiedenen Pferden, wie auch zwischen den Darmabschnitten, recht grosse Unterschiede vorhanden. Somit konnte keine Korrelation zwischen der Expression der VDR-mRNA und der Expression des Proteins festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz ist, dass die VDR-Expression auch beim Pferd auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert wird. Mohri et al. (2009) konnten zeigen, dass der VDR des Menschen auf der posttranskriptionellen Ebene durch microRNAs reguliert wird. Bei den microRNAs handelt es sich um kleine, nicht-kodierende RNAs, welche die Genexpression über eine Hemmung der Translation oder den Abbau von mRNA regulieren. Da der VDR im Dickdarm nur bei drei Tieren nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass bei vermindertem Angebot oder erhöhtem Bedarf die aktive Ca-Aufnahme im Dickdarm induziert wird. Eine Regulation der Ca-Aufnahme im Dickdarm wurde bereits in Untersuchungen an Wiederkäuern nachgewiesen. In einer Studie (Goff et al., 1995) wurde bei Jersey-Kühen während jeweils zwei Wochen ante und post partum die VDR-Zahl im Colon mittels Ligand-Binding-Assay bestimmt. Die VDR-Menge im Colon war während der späten Trächtigkeit 3-4 mal höher als die VDR-Menge im Colon von nicht-laktierenden Kühen. Während der Frühlaktation war die VDR-Zahl im Colon ähnlich jener der späten Trächtigkeit. Auch Liesegang et al. (2007) beobachteten bei Ziegen und Schafen post partum einen signifikanten Abfall der VDR-Menge in Colonschleimhaut-Biopsien. Rourke et al. (2010) stellten die grösste VDR-mRNA-Expression im Colon von Pferden fest, im Gegensatz zu den Transportproteinen Calb9k und TRPV6. Dies kann als Hinweis gesehen werden, dass die transzelluläre Ca-Absorption beim Pferd weniger stark von Vitamin D₃ abhängig ist wie bei anderen Spezies.

Der VDR hat neben seiner Bedeutung als Transkriptionsfaktor für Proteine, welche der Erhaltung der Ca-Homöostase dienen, verschiedene andere Funktionen (vgl. Kapitel 4.2.2) (Haussler et al., 1995). Die Bedeutung des VDR für die aktive Ca-Absorption des Pferdes ist noch nicht vollständig geklärt. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass der VDR

auch im Gastrointestinaltrakt des Pferdes Funktionen übernimmt, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Ca-Absorption stehen.

Die Verteilung der VDR bei anderen Tierarten wurde mittels immunhistochemischen Methoden bereits mehrfach untersucht. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Resultaten war sowohl bei Kühen (Liesegang et al., 2008) als auch bei Schafen und Ziegen (Riner, 2008; Boos et al., 2007; Liesegang et al., 2007) die grösste VDR-Menge im Duodenum nachzuweisen. Beim Kaninchen hingegen war die grösste Menge an VDR im Caecum zu beobachten (de Vries de Heekelingen, 2008). Die hohe VDR-Menge im Duodenum des Pferdes könnte auf eine starke Ca-Absorption in diesem Darmabschnitt hinweisen. Daraus ist zu folgern, dass Dickdarmverdauung untereinander durchaus speziesspezifische Eigenheiten im Ca-Stoffwechsel aufweisen, was hier am Beispiel des VDR vom Pferd im Vergleich zum Kaninchen aufgezeigt wurde.

7.3 Calbindin D9k im Gastrointestinaltrakt des Pferdes

Die stärkste Expression von Calb9k im Gastrointestinaltrakt des Pferdes wurde sowohl auf der Proteinebene wie auch auf mRNA-Ebene im Duodenum nachgewiesen. Im Jejunum wurde Calb9k deutlich schwächer, aber ebenfalls konstant bei allen untersuchten Tieren exprimiert. Weiter konnte eine abnehmende Calb9k-Expression im Caecum, Ileum und ventralen Colon ascendens festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine Untersuchung auf mRNA-Ebene, bei der die stärkste Calb9k-Expression im Duodenum und proximalen Jejunum der Pferde auftrat (Rourke et al., 2010). Die beim Pferd aufgezeigte, von proximal nach distal abnehmende Calb9k-Expression wurde in verschiedenen Studien an Kühen, Mäusen und Ziegen ebenfalls nachgewiesen (Schröder et al., 1998; Yamagishi et al., 2002; van Abel et al., 2003; Yamagishi et al., 2006; Sidler-Lauff et al., 2010). Calb9k ist ein wichtiger Faktor der aktiven Ca-Absorption im Darmtrakt (Roche et al., 1986; Wasserman und Fullmer, 1989). Allerdings scheint eine aktive Ca-Absorption auch in Abwesenheit von Calb9k und TRPV6 möglich zu sein (Benn et al., 2008). Auch Akhter et al. (2006) unterstützen die Hypothese eines alternativen Weges der aktiven Ca-Aufnahme und intrazellulären Ca-Diffusion im Darmtrakt, bei welchem Calb9k nicht benötigt wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Calb9k bei der Ca-Absorption bei Calb9k-knock-out-Mäusen durch andere Proteine wie TRPV5 und PMCA1b kompensiert werden kann (Lee et al., 2007). Aufgrund der Resultate der vorliegenden Studie können die Mengen an Calb9k als Indikator für die Höhe der Ca-Absorption gesehen werden, da im Duodenum

die Mengen an Calb9k und VDR, wie auch die gemessene Ca-Absorption in der Ussing-Kammer, am grössten waren.

Aufgrund der immunhistochemischen Anfärbung scheint Calb9k beim Pferd v.a. in den Enterozyten des Oberflächenepithels vorhanden zu sein und in einem geringeren Ausmass in den Zellen der Krypten. Ähnliche Ergebnisse konnten Taylor et al. (1984) im Duodenum von Ratten feststellen, bei denen Calb9k hauptsächlich in der Spitze der Darmzotten und im oberen Bereich der Krypten nachgewiesen wurde. In einer weiteren Studie wurde ein zweifach höherer Ca-Transport in den Enterozyten der Darmzotten im Vergleich zu den Zellen der Krypten gemessen (Smith et al., 1985). Da Calb9k und der ATP-abhängige Ca-Transport vorwiegend in den Enterozyten der Darmzotten lokalisiert sind, scheint die Vit D-abhängige Ca-Absorption in diesen Zellen stattzufinden (van Corven et al., 1985). Die Meinung, dass in reifen Enterozyten die grösste Kapazität für einen transzellulären Ca-Transport besteht, wird durch Untersuchungen von Walters und Weiser (1987) unterstützt.

7.4 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Studie erhaltenen positiven Korrelationen der Expression von VDR und Calb9k mit der gemessenen Ca-Absorption in der Ussing-Kammer deuten darauf hin, dass diese Transportelemente, wie bei anderen Spezies, ebenfalls für den transzellulären Ca-Transport auch beim Pferd bedeutend sind. Die Ergebnisse können ferner als Hinweis darauf gesehen werden, dass im Gegensatz zum Kaninchen beim Pferd die aktive Ca-Absorption hauptsächlich im Duodenum stattfindet. Das Vorkommen von VDR und Calb9k im Dickdarm des Pferdes lässt vermuten, dass eine Ca-Absorption prinzipiell auch in diesen Darmabschnitten möglich wäre. Da die aktive Ca-Absorption in den meisten Fällen durch eine Ca-Mangelversorgung stimuliert wird, sind weitere Untersuchungen mit Fütterungsgruppen mit unterschiedlichen Ca-Gaben empfohlen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Akhter, S., G. D. Kutuzova, S. Christakos und H. F. DeLuca (2006). Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated Ca²⁺ absorption in small intestine. *Arch Biochem Biophys* 460(2): 227-32.

Benn, B. S., D. Ajibade, A. Porta, P. Dhawan, M. Hediger, J. B. Peng, Y. Jiang, G. T. Oh, E. B. Jeung, L. Lieben, R. Bouillon, G. Carmeliet and S. Christakos (2008). Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. *Endocrinology* 149(6): 3196-205.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko und L. Stryer (2001). Conformational changes in calmodulin on calcium binding. In: *Biochemistry*, 4th Edition. Stryer L. (Hrsg.). New York, WH Freeman and Company: 410.

Berlin, D. und I. Aroch (2009). Concentrations of ionized and total magnesium and calcium in healthy horses: effects of age, pregnancy, lactation, pH and sample type. *Vet J* 181(3): 305-11.

Boos, A., K. Riner, M. Hässig und A. Liesegang (2007). Immunohistochemical demonstration of vitamin D receptor distribution in goat intestines. *Cells Tissues Organs* 186(2): 121-8.

Bouillon, R., W. H. Okamura und A. W. Norman (1995). Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16(2): 200-57.

Breidenbach, A., C. Schlumbohm, J. Harmeyer (1998). Peculiarities of vitamin D and of the calcium and phosphate homeostatic system in horses. *Vet Res* 29(2):173-86

Breves, G., M. Diner, H. J. Ehrlein, W. von Engelhardt, M. Kaske, S. Leonhard-Marek, H. Martens, P. D. Moller, E. Scharrer, M. Schemann und S. Wolffram (2000). Physiologie des Magen-Darm-Kanals. In: *Physiologie der Haustiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag: 313-422.

Breves, G. und B. Schröder (2005). Vergleichende Aspekte der gastrointestinalen Calcium-Umsetzungen beim Schwein und Wiederkäuer. *Lohmann Information* 1-3.

Bronner, F. (1987). Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* 117(8): 1347-52.

Bronner, F. (2003). Mechanisms of Intestinal Calcium Absorption. *J Cell Biochem* 88(2):387-393.

Bronner, F. (2009). Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutr Rev* 67(2): 109-13.

Bronner, F., D. Pansu und W. D. Stein (1986). An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol* 250(5 Pt 1): G561-9.

- Caple, I. W., P. A. Doake und P. G. Ellis (1982). Assessment of the calcium and phosphorus nutrition in horses by analysis of urine. *Aust Vet J* 58(4): 125-31.
- Cehak, A., F. Geburek, K. Feige, B. Schröder and G. Breves (2009). Functional characterisation of calcium and phosphate transport across the equine intestine. *Proc. Soc. Nutr. Physiol*: 137.
- Christakos, S., F. Barletta, M. Huening, P. Dhawan, Y. Liu, A. Porta und X. Peng (2003). Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem* 88(2): 238-44.
- Christakos, S., P. Dhawan, Y. Liu, X. Peng und A. Porta (2003). New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88(4): 695-705.
- Christakos, S., C. Gabrielides und W. B. Rhoten (1989). Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev* 10(1): 3-26.
- Christakos, S., R. Gill, S. Lee und H. Li (1992). Molecular aspects of the calbindins. *J Nutr* 122(3 Suppl): 678-82.
- Clarke, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(6): G1151-66.
- Clemens, T. L., K. P. Garrett, X. Y. Zhou, J. W. Pike, M. R. Haussler und D. W. Dempster (1988). Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology* 122(4): 1224-30.
- Cramer, C. F. (1965). Sites of Calcium Absorption and the Calcium Concentration of Gut Contents in the Dog. *Can J Physiol Pharmacol* 43: 75-8.
- de Vries de Heekelingen, T. (2008). Immunhistochemische Untersuchung zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Kaninchen. *Veterinär-Anatomisches Intstiut. Zürich, Universität Zürich*: 72.
- DeLuca, H. F. (1982). Metabolism and molecular mechanism of action of vitamin D: 1981. *Biochem Soc Trans* 10(3): 147-58.
- Dupret, J. M., P. Brun, C. Perret, N. Lomri, M. Thomasset und P. Cuisinier-Gleizes (1987). Transcriptional and post-transcriptional regulation of vitamin D-dependent calcium-binding protein gene expression in the rat duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J Biol Chem* 262(34): 16553-7.
- Dusso, A. S., A. J. Brown und E. Slatopolsky (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F8-28.
- Favus, M. J. und C. Pak (2001). Evidence for absorption of ionic calcium and soluble calcium complexes by the duodenum and cecum in the rat. *Am J Ther* 8(6): 425-31.
- Ferraris, R. P., S. A. Villenas und J. Diamond (1992). Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am J Physiol* 262(6 Pt 1): G1047-59.

- Fullmer, C. S. und R. H. Wasserman (1981). The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein. *J Biol Chem* 256(11): 5669-74.
- Goff, J. P., T. A. Reinhardt und R. L. Horst (1995). Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 78(11): 2388-94.
- Haussler, M. R. (1986). Vitamin D receptors: nature and function. *Annu Rev Nutr* 6: 527-62.
- Haussler, M. R., P. W. Jurutka, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. A. Haussler und G. K. Whitfield (1995). New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 17(2 Suppl): 33S-38S.
- Haussler, M. R., D. J. Mangelsdorf, B. S. Komm, C. M. Terpening, K. Yamaoka, E. A. Allegretto, A. R. Baker, J. Shine, D. P. McDonnell und M. Hughes (1988). Molecular biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 44: 263-305.
- Hoenderop, J. G., B. Nilius und R. J. Bindels (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85(1): 373-422.
- Holick, M. F. (2003). Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 88(2): 296-307.
- Holler, H., G. Breves, M. Kocabatmaz und H. Gerdes (1988). Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol* 73(4): 609-18.
- Horst, R. L., J. P. Goff und T. A. Reinhardt (1994). Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* 77(7): 1936-51.
- Horst, R. L., J. P. Goff und T. A. Reinhardt (2003). Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. *Acta Vet Scand Suppl* 97: 35-50.
- Hunziker, W. und S. Schrickel (1988). Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol Endocrinol* 2(5): 465-73.
- Junqueira, L. C. und J. Carneiro (1991). Verdauungsorgane. In: *Histologie*. Berlin, Springer Verlag: 465-514.
- Jurutka, P. W., G. K. Whitfield, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, C. A. Haussler und M. R. Haussler (2001). Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord* 2(2): 203-16.
- Kallfelz, F. A., A. N. Taylor und R. H. Wasserman (1967). Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 125(1): 54-8.
- Karbach, U. und H. Feldmeier (1993). The cecum is the site with the highest calcium absorption in rat intestine. *Dig Dis Sci* 38(10): 1815-24.
- Kaune, R. (2000). Knochenstoffwechsel. In: *Physiologie der Haussäugetiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 621-25.

- Khanal, R. C. und I. Nemere (2008). Regulation of intestinal calcium transport. *Annual Review of Nutrition* 28: 179-196.
- Kraft, W., M. Früll, H. Bostedt und K. Heinritzi (2005). Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. W. Kraft und U.M. Dürr (Hrsg.). Stuttgart, Schattauer: 266-80.
- Krüdewagen, E. M. (1996). Untersuchungen zum Oestrogenrezeptornachweis im Pferdeendometrium-Vergleich verschiedener Methoden. Dissertation. Hannover.
- Lee, G. S., K. Y. Lee, K. C. Choi, Y. H. Ryu, S. G. Paik, G. T. Oh und E. B. Jeung (2007). Phenotype of a calbindin-D9k gene knockout is compensated for by the induction of other calcium transporter genes in a mouse model. *J Bone Miner Res* 22(12): 1968-78.
- Liebich, H.-G. (2010). Verdauungsapparat. In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Stuttgart, Schattauer Verlag: 191-254.
- Liesegang, A., K. Riner und A. Boos (2007). Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep. *Domest Anim Endocrinol* 33(2): 190-202.
- Liesegang, A., K. Singer und A. Boos (2008). Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisean cows of different age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92(3): 316-23.
- Marcus, C. S. und F. W. Lengemann (1962). Absorption of Ca⁴⁵ and Sr⁸⁵ from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat. *J Nutr* 77: 155-60.
- Marshman, E., C. Booth und C. S. Potten (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24(1): 91-8.
- Meinecke, B. (2000). Allgemeine Endokrinologie. In: *Physiologie der Haustiere*. W.v.Engelhardt und G.Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 490-97.
- Mohri, T., M. Nakajima, S. Takagi, S. Komagata und T. Yokoi (2009). MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer* 125(6): 1328-33.
- Mosimann, W. und T. Kohler (1990). Verdauungsorgane. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin, Paul Parey: 153-81.
- Nakada, M., R. U. Simpson und H. F. DeLuca (1984). Subcellular distribution of DNA-binding and non-DNA-binding 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in chicken intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(21): 6711-3.
- Nellans, H. N. (1988). Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport. *Prog Clin Biol Res* 252: 269-76.
- Nelson, D. und M. Cox (2001). Lipide. In: *Lehninger Biochemie*. D. Nelson und M. Cox (Hrsg.). Berlin, Springer: 381-410.
- Norman, A. W. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147(12): 5542-8.

Norman, A. W., S. Ishizuka und W. H. Okamura (2001). Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1-5): 49-59.

Norman, A. W., I. Nemere, L. X. Zhou, J. E. Bishop, K. E. Lowe, A. C. Maiyar, E. D. Collins, T. Taoka, I. Sergeev and M. C. Farach-Carson (1992). 1,25(OH)₂-vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8): 231-40.

Oberleitner, H. (1996). Salz- und Wasserhaushalt. In: *Lehrbuch der Physiologie*. Klinke, R. und Silbernagel, S. (Hrsg.). Stuttgart, Thieme: 337-64.

Panda, D. K., D. Miao, I. Bolivar, J. Li, R. Huo, G. N. Hendy und D. Goltzman (2004). Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 279(16): 16754-66.

Parmentier, M., M. Ghysens, F. Rypens, D. E. Lawson, J. L. Pasteels und R. Pochet (1987). Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and Western blot analysis. *Gen Comp Endocrinol* 65(3): 399-407.

Penzlin, H. (2005). Verdauung. In: *Lehrbuch der Tierphysiologie*. München, Elsevier: 219-45.

Pike, J. W. und M. R. Haussler (1979). Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11): 5485-9.

Pillai, S., D. D. Bikle und P. M. Elias (1988). 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem* 263(11): 5390-5.

Pinto, D. und H. Clevers (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 306(2): 357-63.

Ricken, G. E. (2005). Transport von Calcium über das isolierte Pansenepithel des Rindes. Tierärztliche Hochschule. Hannover.

Riner, K., A. Boos, M. Hässig und A. Liesegang (2008). Vitamin D receptor distribution in intestines of domesticated sheep *Ovis ammon f. aries*. *J Morphol* 269(2): 144-52.

Roche, C., C. Bellaton, D. Pansu, A. Miller, 3rd und F. Bronner (1986). Localization of vitamin D-dependent active Ca²⁺ transport in rat duodenum and relation to CaBP. *Am J Physiol* 251(3 Pt 1): G314-20.

Rosol, T. J. und C. C. Capen (1997). Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, fifth ed. Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.). San Diego, Academic Press: 619-702.

Rourke, K. M. , S. Coe, C.W. Kohn, T.J. Rosol, F.J.Mendoza, R.E. Toribio. (2010). Cloning, comparative sequence analysis and mRNA expression of calcium-transporting genes in horses. *Gen Comp Endocrinol* 167(1): 6-10.

Scharrer, E. und S. Wolfram (2000). Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. In: *Physiologie der Haussäugetiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 369-94.

Schröder, B., O. Hattenhauer und G. Breves (1998). Phosphate transport in pig proximal small intestines during postnatal development: lack of modulation by calcitriol. *Endocrinology* 139(4): 1500-7.

Schröder, B., I. Rittmann, E. Pfeffer und G. Breves (1997). In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol B* 167(1): 43-51.

Schryver, H. F., T. J. Foose, J. Williams und H. F. Hintz (1983). Calcium excretion in feces of ungulates. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 74(2): 375-9.

Schryver, H. F., H. F. Hintz und J. E. Lowe (1974). Calcium and phosphorus in the nutrition of the horse. *Cornell Vet* 64(4): 493-515.

Schryver, H. G., P. H. Craig, H. F. Hintz, D. E. Hogue und J. E. Lowe (1970). Site of calcium absorption in horse. *Journal of Nutrition* 100(10): 1127-31.

Sidler-Lauff, K., A. Boos, M. Kraenzlin und A. Liesegang (2010). Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor- and calbindin D9k-immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids. *Journal of Animal Science* (Epub ahead of print)

Singer, K. (2006). Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse Institut für Tierernährung. Zürich, Universität Zürich: 96.

Smith, M. W., M. E. Bruns und E. D. Lawson (1985). Identification of intestinal cells responsive to calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol). *Biochem J* 225(1): 127-33.

Sooy, K., T. Schermerhorn, M. Noda, M. Surana, W. B. Rhoten, M. Meyer, N. Fleischer, G. W. Sharp und S. Christakos (1999). Calbindin-D(28k) controls $[Ca^{2+}]_i$ and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem* 274(48): 34343-9.

Sykes, A. und A. Russel (2007). Deficiency of mineral macro-elements. In: *Disease of sheep*. Aitken, I.D. und Martin, W.B. (Hrsg.). Oxford, Blackwell: 323-24.

Taylor, A. N., W. A. Gleason, Jr. und G. L. Lankford (1984). Immunocytochemical localization of rat intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J Histochem Cytochem* 32(2): 153-8.

Toribio, R. E. (2004). Calcium Disorders. In: *Equine Internal Medicine*. S.M.Reed, W.M.Bayly, D.C.Sellon. St. Louis, Elsevier: 1295-1327.

- Ussing, H. H. und K. Zerahn (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23(2-3): 110-27.
- van Abel, M., J. G. Hoenderop, A. W. van der Kemp, J. P. van Leeuwen und R. J. Bindels (2003). Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(1): G78-85.
- van Corven, E. J., C. Roche und C. H. van Os (1985). Distribution of Ca^{2+} -ATPase, ATP-dependent Ca^{2+} -transport, calmodulin and vitamin D-dependent Ca^{2+} -binding protein along the villus-crypt axis in rat duodenum. *Biochim Biophys Acta* 820(2): 274-82.
- van Eldik, L. J., J. G. Zendegui, D. R. Marshak und D. M. Watterson (1982). Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action. *Int Rev Cytol* 77: 1-61.
- Vollmerhaus, B. und H. Roos (2004). Speiseröhre, Magen, Darm, Darmanhangsdrüsen. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, 9. Auflage. Nickel R., Schummer, A. und Seiferle, E. (Hrsg.). Berlin, Parey Verlag: 198-209.
- von Essen, M. R., M. Kongsbak, P. Schjerling, K. Olgaard, N. Odum und C. Geisler (2010). Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol*.
- Walters, J. R. und M. M. Weiser (1987). Calcium transport by rat duodenal villus and crypt basolateral membranes. *Am J Physiol* 252(2 Pt 1): G170-7.
- Warren, H. B., N. C. Lausen, G. V. Segre, G. el-Hajj und E. M. Brown (1989). Regulation of calciotropic hormones in vivo in the New Zealand white rabbit. *Endocrinology* 125(5): 2683-90.
- Wasserman, R. H., J. S. Chandler, S. A. Meyer, C. A. Smith, M. E. Brindak, C. S. Fullmer, J. T. Penniston und R. Kumar (1992). Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. *J Nutr* 122(3 Suppl): 662-71.
- Wasserman, R. H. und C. S. Fullmer (1983). Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Annu Rev Physiol* 45: 375-90.
- Wasserman, R. H. und C. S. Fullmer (1989). On the molecular mechanism of intestinal calcium transport. *Adv Exp Med Biol* 249: 45-65.
- Wasserman, R. H. und A. N. Taylor (1966). Vitamin D₃-Induced Calcium-Binding Protein in Chick Intestinal Mucosa. *Science* 152(3723): 791-793.
- Weyrauch, K. D. und A. Smollich (2009). Verdauungssystem. In: *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. K. D. Weyrauch und A. Smollich (Hrsg.). Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag: 59-87.
- Yamagishi, N., M. Miyazaki und Y. Naito (2006). The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J* 171(2): 363-6.

Yamagishi, N., Y. A. Yukawa, N. Ishiguro, S. Soeta, I. H. Lee, K. Oboshi und H. Yamada (2002). Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 49(9): 461-5.

9 ANHANG

Citratpuffer (10mM, pH 6.0)

Stammlösung A: 0.1M Zitronensäure

$C_6H_8O_7 \times H_2O$	21.0g
Aqua dest.	ad 1000ml

Stammlösung B: 0.1M Natriumcitrat

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$	29.41g
Aqua dest.	ad 1000ml

Gebrauchslösung

Stammlösung A	9ml
Stammlösung B	41ml
Aqua dest.	450ml

DEPC-Wasser (0.1 %)

1 ml DEPC auf 1 l Aqua dest.

12 h bei 37 °C unter Rühren inkubieren

20 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

NET-2-Buffer, pH 7.4

NaCl (300mM)	4.384g
Tris-HCL (50mM)	1.97g
NP-40 (0.05%)	125mg or μ l
H ₂ O	ad 250ml

Parson-Puffer

NaCl	107.00 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0.20 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	1.80 mmol/l
KCl	4.50 mmol/l
NaHCO ₃	25.00 mmol/l
CaCl ₂	1.25 mmol/l

MgSO ₄	1.00 mmol/l
Glukose	122.00 mmol/l

PBS 10x

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	14.4g
KH ₂ PO ₄	2.4g
Aqua dest.	ad 1000ml

PBS/Tween

PBS 10x	100ml
Aqua dest.	ad 1000ml
Tween 20	2.5ml

4x Sample Buffer

H ₂ O	16ml
0.5 M Tris pH 6.8	4ml
Glycerol	3.2ml
10% SDS	6.4ml
β-Mercapto.	1.6ml
0.2% Bromphenolblau	0.8ml

TBE 10 x

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	40 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tris-Puffer, pH 7,6

Tris	6,1g
Aqua dest.	50ml (Tris in Aqua dest. lösen)
Salzsäure 1N	37ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

TBS, pH 7.6

Tris-Puffer	100ml
NaCl-Lösung	ad 1000ml

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und auf deren Unterstützung ich stets zählen konnte:

Herrn Prof. Dr. A. Boos für die gute Betreuung und Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Frau PD Dr. A. Liesegang für die Idee zu dieser Arbeit, die fachlichen Inputs und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Kowalewski für die Einführung und Unterstützung bei den molekularbiologischen Experimenten.

Frau med. vet. Nele Sprechler für die gute Zusammenarbeit bei den Experimenten.

Sissi Högger, Ines Mittner und Urs Büchler für die Hilfe beim Durchführen der Laborarbeiten.

Kathrin Süss für die Hilfe bei der Probensammlung

Meinen Mitdoktorandinnen Silvia Leimbacher, Birgit Harrer, Corinne Schröter, Andrea Meyer, Nele Sprechler und Barbara Fox für die tolle Stimmung im Büro und die fachliche wie auch persönliche Unterstützung.

Meinen Eltern für die Ermöglichung meines Berufswunsches und die Begleitung sowohl während des Studiums wie auch beim Erstellen der Doktorarbeit.

11 LEBENS LAUF

Name: Tobias Müller

Geburtsdatum: 18. Dezember 1983

Heimatort: Bettwiesen (Thurgau)

Zivilstand: ledig

1990-1996 Primarschule in Abtwil

1996-1998 Oberstufe in Abtwil

1998-2002 Kantonsschule St.Gallen, Matura mit Schwerpunkt Latein

2003-2008 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich;

Vertiefungsrichtung Kleintiere;

Staatsexamen im Herbst 2008

2008-2010 Erstellung der Dissertation am Veterinäranatomischen Institut der

Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich bei Prof. Dr. med. vet. A. Boos

ab Februar 2010 Anstellung als Assistenztierarzt in einer Gemischtpraxis in Winterthur bei

Dr. med. vet. A. Peter